



HAL
open science

Stratégie de prévention de la maladie d'Alzheimer : Étude du rôle de la vitamine A

Essi Fanny Biyong

► **To cite this version:**

Essi Fanny Biyong. Stratégie de prévention de la maladie d'Alzheimer : Étude du rôle de la vitamine A. Alimentation et Nutrition. Université de Bordeaux; Université Laval (Québec, Canada), 2019. Français. NNT : 2019BORD0385 . tel-03527518

HAL Id: tel-03527518

<https://theses.hal.science/tel-03527518>

Submitted on 16 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Réalisée en cotutelle en vue de l'obtention du

DOCTORAT

SPÉCIALITÉ : SCIENCES PHARMACEUTIQUES (Québec) et NUTRITION (Bordeaux)

Délivré par :

La Faculté de Pharmacie de l'Université Laval, Québec, Canada

L'école doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Bordeaux,
Bordeaux, France

Stratégie de prévention de la maladie d'Alzheimer : Étude du rôle de la vitamine A

Soutenue le 16 Décembre 2019 par

Essi Fanny BIYONG

JURY

Valérie ENDERLIN

Professeur des Universités – Université Paris-Sud

Rapporteur et
Présidente du jury

Wojciech KREZEL

Directeur de Recherche INSERM – Université de Strasbourg

Rapporteur

Stéphanie DUDONNÉ

Professeur de l'Université Laval (Québec) – Faculté des sciences de l'agriculture et
de l'alimentation

Examinatrice

Laurent GIVALOIS

Chargé de Recherche CNRS – Université de Montpellier

Examineur

Guillaume FERREIRA

Directeur de Recherche INRAE – Université de Bordeaux

Invité

Frédéric CALON

Professeur de l'Université Laval (Québec) – Faculté de Pharmacie

Co-directeur de thèse

Véronique PALLET

Professeur des Universités – Bordeaux INP

Co-directrice de thèse

Résumé

La vitamine A (VA), ou rétinol, est une molécule essentielle au maintien des processus neurobiologiques de la mémoire tout au long de la vie. Dans le cerveau, le rétinol est métabolisé en acide rétinoïque (AR), le métabolite actif de la VA, qui se lie à ses récepteurs nucléaires, les RARs et les RXRs. Le complexe ainsi formé active la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la mémoire.

Des données obtenues chez l'Homme et l'animal plaident en faveur d'un affaissement de la voie de signalisation de l'AR survenant au cours du vieillissement, associé à des perturbations mnésiques. Par ailleurs, la diminution de l'activité de la signalisation de l'AR a également été associée à l'accumulation dans le cerveau de peptides amyloïdes- β ($A\beta$). Or, l'accumulation de ces peptides et l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau sont les deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA). La MA associe des troubles cognitifs importants, de mémoire principalement, conduisant inexorablement à la perte d'autonomie des malades. Son étiologie est encore mal connue, mais son facteur de risque majeur est le vieillissement. Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse qu'une diminution de l'activité de la signalisation de l'AR dans le cerveau au cours du vieillissement favorise le développement des lésions caractéristiques de la MA, et contribue au développement de la maladie.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer si une supplémentation nutritionnelle en VA au cours du vieillissement, en maintenant une activité optimale de sa signalisation cérébrale, pouvait prévenir la mise en place des lésions caractéristiques de la MA chez deux modèles complémentaires. Le premier modèle murin (injection intra-cérébro-ventriculaire aiguë de peptides amyloïdes) développe une neurotoxicité induite par le peptide $A\beta_{25-35}$ et est mis en œuvre rapidement (semaines). Le second modèle est la souris 3xTg-AD, qui exprime les transgènes responsables du développement progressif de la neuropathologie de type Alzheimer au cours du vieillissement (mois).

Chez les deux modèles, la supplémentation en VA a permis de préserver la mémoire spatiale à court-terme dépendante de l'hippocampe. Chez le modèle $A\beta_{25-35}$, les mécanismes sous-jacents n'ont pas pu être déterminés de façon univoque. Cependant, ils impliqueraient une augmentation de la production d'AR dans l'hippocampe en réponse à la supplémentation. Chez le modèle de souris 3xTg-AD, l'effet protecteur de la VA s'accompagne d'une diminution de la production de peptides $A\beta$ dans l'hippocampe, ainsi que de la diminution de la phosphorylation de tau chez les mâles uniquement. Chez les

femelles, l'apport de VA n'a pas eu de conséquence sur la phosphorylation de tau, mais a accentué leur production de peptides A β , qui était déjà initialement plus prononcée que chez les mâles. Cependant, l'expression hippocampique des récepteurs de l'AR, qui témoigne de l'activité de la voie de signalisation de l'AR, variait négativement avec la quantité de peptides A β chez les deux sexes, mais de façon plus marquée chez les mâles. Ainsi, la baisse d'activité de la signalisation de l'AR serait aussi néfaste pour les femelles que les mâles. Toutefois, le régime enrichi en VA s'est avéré inefficace pour prévenir les lésions caractéristiques de la MA, voire délétère chez les femelles.

Ainsi, nos travaux renforcent l'idée que le maintien d'un bon statut en VA, par voie nutritionnelle, au cours du vieillissement, est une stratégie de prévention de la MA à considérer chez les hommes. Cependant, pour les femmes, une autre stratégie plus efficace que l'intervention nutritionnelle devrait être envisagée.

Enfin, ces résultats confirment l'intérêt de poursuivre l'étude des liens entre vitamine A et MA et soulignent la nécessité d'encourager l'étude des effets du sexe dans les investigations précliniques portant sur la MA, sachant de plus que cette maladie affecte plus de femmes que d'hommes.

Abstract

Vitamin A (VA), or retinol, is an essential molecule for the maintenance of the neurobiological processes underlying memory formation throughout life. In the brain, retinol is turned into retinoic acid (RA), the active metabolite of VA, which binds to its receptors, the RARs and the RXRs belonging to the nuclear receptor superfamily, leading to the transcription of target genes involved in memory processes.

Data obtained in humans and animals suggest that a decrease of RA signaling activity occurs during aging and is associated to memory impairments. Furthermore, the decrease of RA signaling activity has been associated to the accumulation of β -amyloid peptides ($A\beta$) in the brain. The accumulation of these peptides and the abnormal hyperphosphorylation of tau are the two histopathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). AD involves significant cognitive dysfunction, including memory loss, leading ultimately to the loss of self-reliance of people affected by the disease. Its etiology is still misunderstood, but the major risk factor for developing AD is advancing age. Thus, we formulated the hypothesis that the age-related reduction of RA signaling activity in the brain favors the development of the neuropathology characterizing AD, contributing to the development of the disease.

The goal of this thesis was to evaluate whether a dietary VA supplementation during aging, providing an optimal VA signaling activity in the brain, could prevent the onset of the lesions characterizing AD in two complementary mouse models of the disease. The first model (intra-cerebro-ventricular acute injection of amyloid peptides) develops a neurotoxicity induced by the $A\beta_{25-35}$ peptide and is rapid to set up (weeks). The second model is the 3xTg-AD mouse which expresses the transgenes allowing the progressive development during aging (months) of Alzheimer-type neuropathology in the brain.

In both models, VA supplementation succeeded to preserve their hippocampus-dependent short-term spatial memory. In the $A\beta$ model, the mechanisms underlying this beneficial effect could not be precisely determined. However, they seem to involve an increase of hippocampal RA production induced by VA supplementation. In the 3xTg-AD mouse model, the protective effect of VA was accompanied by a decrease in both the production of $A\beta$ peptides and the phosphorylation of tau in the hippocampus of males only. In females, VA-enriched diet had no effect on tau phosphorylation but exacerbated their $A\beta$ peptide production which was initially already higher than the one of males. However, the hippocampal expression of RA receptors, giving evidence for its signaling activity, varied

negatively with the amount of amyloid peptides in both sexes, but in a strongest manner in males. Thus, a reduction of RA signaling activity is equally deleterious for females and males. However, VA-enriched diet was inefficient in preventing Alzheimer's neuropathology females and even deleterious.

Altogether, our results reinforce the idea that keeping an adequate VA status up by nutritional means during aging is a strategy to consider for the prevention of AD in males. However, another strategy, more efficient, should be considered for females.

Finally, our results confirm the relevance of investigating the links between VA and AD and should encourage preclinical research to take into account the effects of sex in the investigations regarding AD, especially knowing that this disease is preferentially affecting women.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xii
Abréviations	xiii
Remerciements	xvi
Avant-propos	xix
Introduction.....	1
A. La vitamine A.....	2
I. Absorption de la vitamine A.....	2
a) Sources de vitamine A.....	2
b) Apports de vitamine A recommandés	3
c) Digestion de la vitamine A	5
d) Transport de l'entérocyte à l'hépatocyte	6
II. Métabolisme général de la vitamine A.....	9
a) Stockage de la vitamine A	9
b) Les dérivés de la vitamine A : les rétinoïdes	11
c) Métabolisme cellulaire de la vitamine A.....	12
d) Les récepteurs de l'acide rétinoïque	15
e) Co-régulateurs.....	16
B. Vitamine A et maintien des processus neurobiologiques de la mémoire : conséquences du vieillissement	18
I. Fonction de la vitamine A dans le maintien de la mémoire du cerveau adulte	19
a) Conséquences cognitives de la déplétion génétique des RARs et RXRs.	19
b) Conséquences cognitives de la carence en vitamine A	20
c) Mécanismes de maintien de la mémoire par la signalisation de l'AR.	21
II. Le vieillissement cérébral	23
a) Le vieillissement général	23
b) Le déclin cognitif lié à l'âge.....	25
III. Effets du vieillissement cérébral sur la voie de signalisation des rétinoïdes.....	27
C. La vitamine A dans la prévention de la maladie d'Alzheimer	34
I. La maladie d'Alzheimer	34

a)	Le déclin cognitif léger (MCI) : un état précurseur de la MA.....	34
b)	Diagnostic de la maladie d'Alzheimer	36
c)	La neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer	37
d)	Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et traitements disponibles	40
e)	Modèles animaux de la MA	42
II.	La vitamine A dans la prévention de la maladie d'Alzheimer	45
a)	La signalisation de l'AR dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer	45
b)	Les rétinoïdes : piste thérapeutique de la maladie d'Alzheimer	47
c)	Intérêt d'une approche préventive nutritionnelle	50
D.	Hypothèse et objectifs	54
	Chapitre 1 :	57
	ÉTUDE DES EFFETS PRÉVENTIFS D'UN RÉGIME ENRICHÉ EN VITAMINE A SUR LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE INDUITE PAR L'INJECTION I.C.V DE PEPTIDES Aβ₂₅₋₃₅.....	57
	Résumé.....	58
	Abstract.....	59
A.	Introduction.....	60
B.	Matériel et méthodes	62
I.	Animaux et régimes alimentaires.....	62
a)	Souris destinées à la mise au point du modèle d'injection i.c.v.....	62
b)	Souris destinées à l'évaluation des effets préventifs potentiels de la supplémentation en vitamine A	62
II.	Chirurgie stéréotaxique intracrânienne.....	63
a)	Préparation des solutions de peptides amyloïdes à injecter.....	63
b)	Injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅	63
III.	Évaluations comportementales	64
a)	Le labyrinthe en Y	64
b)	La reconnaissance d'objet.....	65
c)	La piscine de Morris	66
d)	Le labyrinthe en croix surélevé	67
e)	La boîte à compartiments éclairé et sombre	68
IV.	Euthanasie	68
V.	Investigations moléculaires	69
a)	Dosage des peptides A β murins produits	69
b)	Mesure du rétinol plasmatique.....	69
c)	Dosage de la corticostérone plasmatique	69
d)	Expression génique.....	70

VI. Analyse statistique	71
C. Résultats.....	72
I. Mise au point du modèle d'injection i.c.v : évaluations comportementales.....	72
a) Atteintes mnésiques	72
b) Quantification des peptides amyloïdes endogènes A β ₄₀ et A β ₄₂ en réponse à l'injection.	73
II. Étude des effets préventifs potentiels d'un régime enrichi en vitamine A sur la pathologie amyloïde induite par l'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅	74
a) La supplémentation en vitamine A préserve la mémoire spatiale de reconnaissance des souris injectées avec le peptide A β ₂₅₋₃₅	74
b) L'injection de peptides A β ₂₅₋₃₅ et l'activité de l'axe HPA.	76
c) La supplémentation en vitamine A améliore la production hippocampique d'AR des souris A β	77
D. Discussion.....	78
I. La caractérisation comportementale des souris A β	78
II. La préservation de la mémoire des souris A β par le régime enrichi en vitamine A.	79
III. L'influence de la supplémentation en vitamine A sur la protéolyse de l'APP chez les souris A β	80
IV. L'effet bénéfique de la vitamine A sur la mémoire est indépendante de la régulation de l'axe du stress.	81
V. Les mécanismes qui sous-tendent la préservation de la mémoire des souris A β par la vitamine A.....	82
VI. Conclusion	84
E. Figures.....	85
Chapitre 2 :	93
ÉTUDE DES EFFETS PRÉVENTIFS D'UN RÉGIME ENRICHIS EN VITAMINE A SUR LES PERFORMANCES MNÉSQUES ET L'ÉVOLUTION DE LA NEUROPATHOLOGIE ALZHEIMER CHEZ LE MODÈLE DE SOURIS 3xTg-AD.....	93
Résumé.....	94
Abstract.....	95
A. Introduction.....	97
B. Material and Methods.....	99
I. Animals and diets	99
II. Behavioral assessment	99
III. Tissue collection and protein extraction.....	100
IV. A β ₄₀ and A β ₄₂ quantification	101
V. Western Immunoblotting	101

VI. Real-time PCR (RT-PCR).....	101
VII. Plasmatic Retinol	102
VIII. Statistical analysis	102
C. Results.....	103
I. Vitamin A supplementation preserved memory performances of 3xTg-AD mice.	103
II. VA status and signaling.....	103
III. VA-enriched diet reduced A β and tau-pathologies in 3xTg-AD males but not in females.	104
IV. Higher retinoid signaling is associated with reduced to β -amyloid peptide production in 3xTg-AD mice, regardless of VA supplementation.....	105
D. Discussion.....	105
I. VA supplementation preserves hippocampus-dependent memory of 3xTg-AD mice.	105
II. VA-enriched diet has an equivocal effect on VA status and hippocampal signaling according to the sex.	106
III. VA enrichment shows a beneficial effect on AD-neuropathology of males only. .	108
IV. The expression of RXRs is directly related to smaller amounts of amyloid peptides in the hippocampus of both female and male 3xTg-AD mice.	109
V. Conclusion	110
E. Figures.....	111
Conclusion générale	119
A. Synthèse des principaux résultats	120
B. Discussion générale	124
I. Le rôle de la signalisation de l'AR dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer	124
II. Les implications du sexe féminin dans la signalisation de l'AR et le risque de développer la maladie d'Alzheimer.....	127
III. La vitamine A nutritionnelle: un traitement préventif pour l'Homme?.....	132
IV. Conclusion générale.....	134
Bibliographie.....	136

Liste des figures

Figure 1 – Prévalence de la carence en vitamine A estimée chez les enfants âgés de 6 mois à 5 ans en 2013.....	5
Figure 2 – Absorption de la vitamine A.....	8
Figure 3 – Les rétinoïdes et leur précurseur caroténoïde, le β -carotène.....	12
Figure 4 – Métabolisme cellulaire de la vitamine A.....	14
Figure 5 – Hétérodimérisation des RXRs avec d'autres récepteurs nucléaires (RN).	16
Figure 6 – Interaction des co-régulateurs avec les récepteurs selon la présence d'AR. ...	17
Figure 7 – Représentation non exhaustive des différentes fonctions exercées par la vitamine A dans l'organisme.	18
Figure 8 – Marqueurs cellulaires et moléculaires du vieillissement physiologique.	24
Figure 9 – Biomarqueurs de la MA selon l'état de la fonction cognitive des sujets.	35
Figure 10 – Les voies de transformation de l'APP.....	38
Figure 11 – Les enchevêtrements neurofibrillaires.	40
Figure 12 – Prévalence mondiale de la maladie d'Alzheimer selon l'âge et le sexe.	41
Figure 13 – Schéma représentatif du moment le plus approprié (hypothétiquement) pour prévenir la maladie d'Alzheimer.	51
Figure 14 – Photographies de cerveaux ayant permis de contrôler la validité des coordonnées choisies pour l'injection dans le ventricule latéral.....	63
Figure 15 – Protocole d'évaluation de la mémoire spatiale de reconnaissance dans le labyrinthe en Y (court-terme).	65
Figure 16 – Protocole d'évaluation de la mémoire de reconnaissance dans le test de la reconnaissance d'objet (long-terme).	65
Figure 17 – Schéma descriptif du protocole suivi pour le test de la piscine de Morris.....	67
Figure 18 – Boîte à compartiments éclairé/sombre.	68
Figure 19 – Caractérisation comportementale du modèle d'injection i.c.v. de peptides $A\beta_{25-35}$	85
Figure 20 – Quantité de peptides amyloïdes murins endogènes totaux produits suite à l'injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$	86
Figure 21 – Déroulement du protocole expérimental utilisé pour l'évaluation des effets bénéfiques d'un régime enrichi en vitamine A sur les altérations induites par l'injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$	87

Figure 22 – Étude des effets d'un régime enrichi en vitamine A sur le comportement des souris injectées avec le peptide A β_{25-35} .	88
Figure 23 – Caractérisation de l'état d'activité de l'axe HPA en réponse à l'injection i.c.v du peptide A β_{25-35} et à l'exposition au régime enrichi en vitamine A.	89
Figure 24 – Évaluation de l'expression des récepteurs de l'AR et des gènes impliqués dans l'accumulation de peptides A β .	90
Figure 25 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le modèle de souris A β .	92
Figure 26 – Vitamin A supplementation preserved memory performances of 3xTg-AD mice.	111
Figure 27 – Vitamin A status and signaling.	113
Figure 28 – Vitamin A-enriched diet reduced β -amyloid peptide production and tau-phosphorylation in male 3xTg-AD mice only.	114
Figure 29 – Higher retinoid signaling is associated with reduced β -amyloid production in 3xTg-AD mice, regardless of vitamin A supplementation.	115
Figure 30 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le modèle de souris 3xTg-AD.	118
Figure 31 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans ce projet de thèse.	123
Figure 32 – Mécanismes proposés pour expliquer l'antériorité de la pathologie amyloïde vis-à-vis de la pathologie tau.	127
Figure 33 – Métabolisme central du glucose chez des personnes présentant une fonction cognitive normale mesuré par FDG-TEP.	129

Liste des tableaux

Tableau 1 – Valeurs de référence de la consommation quotidienne de vitamine A (rétinol) chez les hommes adultes.	3
Tableau 2 – Valeurs de référence de la consommation quotidienne de vitamine A (rétinol) chez les femmes adultes.	4
Tableau 3 – Récapitulatif des données concernant le statut rétinolique au cours du vieillissement (Homme).....	30
Tableau 4 – Récapitulatif des études ayant montré des améliorations fonctionnelles et comportementales suite à un traitement à base de vitamine A nutritionnelle ou pharmacologique chez l'animal âgé.	31
Tableau 5 – Récapitulatif des études ayant montré des améliorations fonctionnelles et comportementales suite à un traitement à base de vitamine A nutritionnelle ou pharmacologique chez l'animal âgé (suite).	32
Tableau 6 – Récapitulatif des études ayant montré des améliorations fonctionnelles et comportementales suite à un traitement à base de vitamine A nutritionnelle ou pharmacologique chez l'animal âgé (fin).	33
Tableau 7 – Récapitulatif des études ayant utilisé des rétinoïdes chez des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer.	49
Tableau 8 – Composition des régimes contrôle et enrichi en vitamine A.....	62
Tableau 9 – Récapitulatif des corrélations linéaires entre l'expression hippocampique des récepteurs des rétinoïdes et l'expression d'ADAM10 et d'IDE de tous les groupes expérimentaux confondus.	91
Tableau 10 – Composition of the diet.	116
Tableau 11 – List of the antibodies used for Western Blot.	117
Tableau 12 – Récapitulatif des 14 principales causes de décès aux États-Unis en 2013 et le sexe qu'elles impactent préférentiellement.	132

Abréviations

A β	(Peptide) Amyloïde beta
ADAM10	<i>A Disintegrin and Metalloprotease 10</i>
ADAS-Cog	<i>Alzheimer Disease Assessment Scale - Cognition</i>
ApoB48	Apolipoprotéine B48
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
AR	Acide Rétinoïque
BACE-1	<i>Beta-Amyloid Cleaving Enzyme 1</i>
BCMO1	β -carotène-15,15'-monooxygénase
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
CEL	<i>Carboxyl Ester Lipase</i>
CRABP	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein</i>
CRBP	<i>Cellular Retinol Binding Protein</i>
DHA	Acide docosahexaénoïque
ER	Équivalent Rétinol
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FXR	<i>Farnesid X Receptor</i>
HAT	Histone Acétyl-Transférase
HDAC	Histone Désacétylase
HDM	Histone-déméthylase
HMT	Histone-Méthyl-Transférase
ICV	Intra-cérébro-ventriculaire
IDE	<i>Insulin Degrading Enzyme</i>
IRM	Imagerie par resonance Magnétique
LCR	<i>Liquide Céphalo-Rachidien</i>
LRAT	<i>Lecithin:Retinol Acyl Transferase</i>
LTD	<i>Long Term Depression</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MMSE	<i>Mini Mental State Examination</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
N-CoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NIA-AA	<i>National Institute on Aging and Alzheimer's Association</i>
NSC	Noyau Suprachiasmatique
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PSD-95	<i>Post-Synaptic Density protein 95</i>
PTL	<i>Pancreatic Triglyceride Lipase</i>
RALDH	<i>Retinaldehyde Dehydrogenase</i>
RARs	<i>Retinoic Acid Receptors</i>
RARE	<i>Retinoic Acid Responsive Element</i>
RBP4	<i>Retinol Binding Protein 4</i>
RBPR2	<i>RBP4 - Receptor 2</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
REH	<i>Retinyl ester Hydrolase</i>
RN	Récepteur nucléaire
ROLDH	<i>Retinol Dehydrogenase</i>
RXRs	<i>Retinoid X Receptors</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors</i>
SNC	Système nerveux central
STRA6	<i>Stimulated by Retinoic Acid gene 6</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

TR	<i>Thyroid hormone Receptor α</i>
TTR	Transthyréine
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>

« Le savoir est la seule matière qui s'accroît lorsqu'on le partage. » Socrate

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres de mon jury, Dre Enderlin, Dre Dudonné, Dr Givalois et Dr Krezel d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à l'aide et à la contribution d'un grand nombre de personnes à qui je souhaite exprimer toute ma reconnaissance dans ces quelques lignes.

Je remercie mes directeurs de thèse, Frédéric Calon et Véronique Pallet de m'avoir confiée ce projet et de m'avoir fait confiance pour sa réalisation. Frédéric, je te remercie de ta confiance et d'avoir accepté cette cotutelle qui m'a permis de découvrir la ville de Québec, de rencontrer et de côtoyer ton équipe qui m'a très bien accueillie et qui m'a fait me sentir à l'aise très rapidement. Cette expérience internationale restera pour moi inoubliable. Véronique, je suis immensément reconnaissante du soutien que tu m'as apporté, de ta confiance, de tes mots de réconfort face aux manips qui ne marchaient pas et surtout de m'avoir transmis tous tes précieux conseils tout au long de ma thèse. Tu m'as toujours guidée, épaulée, écoutée et je t'en remercie chaleureusement.

Guillaume, je te remercie d'avoir été mon mentor depuis le premier jour que j'ai passé à NutriNeuro. Je suis chanceuse d'avoir pu m'initier au monde de la recherche à tes côtés et d'avoir pu profiter de tes incroyables qualités de chercheur. Je te remercie du fond du cœur de m'avoir toujours encouragée, challengée, tirée vers le haut, de m'avoir préparée au concours de l'ED et d'avoir toujours cru en moi. Tu as été un soutien constant pour moi et je t'en suis infiniment reconnaissante. C'est avec plaisir et honneur que je t'invite à prendre part à mon jury de thèse.

MPM, ma « daronne » préférée de NutriNeuro, même si t'es un peu ch***te, mais c'est sûrement dû à ton âge (et oui jusqu'au bout je te taquine :) ! Je te dis un immense merci pour l'aide précieuse que tu m'as rendue à de multiples reprises et pour toutes les conversations sans fin que nous avons pu avoir sur tout et n'importe quoi, tous tes conseils, tes lumières sur les tas de questions que j'ai pu avoir, ta disponibilité, tout...! Grosses bises à Greg et toi et un grand merci pour tout.

Serge et Jean-Christophe je vous remercie sincèrement pour votre patience lorsque vous m'avez formée à X choses, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes milliers de questions et de vous être toujours rendus disponibles pour m'aider. C'était un plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie tous les étudiants de NutriNeuro : Anaïs, Hugo, Mathilde C., Camille, Mathilde H., Mathieu, Andy, Lydie, Andrea, Maud, Fanny, Moïra, Julien, Inès, John pour la joie, la bonne humeur, la cohésion, la bonne ambiance qui perdurent dans le bureau depuis toujours et qui se perpétuent de générations en générations d'étudiants. Un grand merci à Marion, Fabien, Charlotte, Yootana, Roman, Quentin et Camille pour avoir été une team

exceptionnelle depuis le début et pour tous les bons moments que nous avons pu passer ensemble au labo et en dehors.

Je remercie également tous les membres de l'équipe de Frédéric, à Québec; Olivier K., Olivier L., Philippe, Manon, Vicky, Tra My, Vincent, Cyntia et Isabelle pour votre accueil, pour m'avoir tout de suite mise à l'aise et pour avoir toujours pris le temps de m'aider quand j'en avais besoin. J'ai adoré mon expérience à Québec en grande partie grâce à vous et je me réjouis d'avoir fait votre connaissance et des moments que nous avons partagés. J'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de nous réunir autour d'un Grand Angus à Laurier ou d'une douzaine d'ailes au PubU.

Marine, Hortense, vous êtes la cerise sur le gâteau de la cotutelle. Marine, je t'ai connue tardivement mais tu es sans conteste une des meilleures rencontres de ma thèse. Hortense, tu as été d'une aide et d'un soutien sans faille dans le parcours semé d'embûches qu'est la cotutelle ! Je vous remercie toutes les deux du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi, votre aide, votre bonne humeur (sauf quand t'as faim Marine, haha), votre réconfort, votre temps, au labo et en dehors. Sans vous, cette cotutelle aurait vraiment eu une autre saveur.

Fabien D., je te remercie pour ton aide et ta contribution aux manips de ma thèse et d'avoir fait tous ces dosages en lumière rouge pour ton plus grand plaisir !

Un grand merci également à Marie-Pierre, Flavie et Isabelle au secrétariat et à l'équipe animalerie de Québec et de Bordeaux dont la composition a changé plusieurs fois, au cours de ma thèse, mais sans qui rien ne serait possible !

Merci à toi Katia pour t'être impliquée dans mon projet malgré les écueils rencontrés.

Merci à toi Sophie L. pour ton écoute et ta bienveillance.

Merci à tous les membres de NutriNeuro pour votre bienveillance à mon égard, votre gentillesse et votre disponibilité, Pierre T, Véronique DSP, Aline, Clémentine, Pauline, Anne-Laure, Céline DC, Katia, Agnès A, Alex, Céline L, Corinne, Nathalie, vu le nombre que nous sommes au laboratoire, j'espère que vous ne m'en voudrez pas de ne pas faire l'énumération de tous les membres au complet, mais le cœur y est !

Merci à la région Aquitaine, à Bordeaux INP, au FRQS et au LIA OptiNutriBrain d'avoir financé ce projet de thèse, et aux Dre Sophie Layé et Dr Frédéric Calon de m'avoir permis de le réaliser au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je remercie Jessica Jean, Sylvie Lacasse, Stéphanie Danaux, Nathalie Vignais, Catherine Ceyrac pour leur aide dans les méandres administratifs universitaires.

Je remercie mes parents, ma famille et tous mes amis pour leur soutien, leurs encouragements et de m'avoir supportée pendant cette thèse. C'est aussi grâce à vous que j'ai pu aller jusqu'au bout de ce parcours.

Enfin, mes derniers mots sont pour toi Clément, qui partage ma vie depuis plus de neuf ans. Je ne te dirai jamais assez merci pour tout le bonheur et l'amour que tu m'apportes. Cette thèse, c'est autant la tienne que la mienne. J'ai une chance incroyable de t'avoir à mes côtés et je te remercie de tout mon coeur pour la force que tu m'as donnée, ton soutien constant dans tous les moments, bons comme moins bons, en dépit de mon stress, de mes angoisses et de mes appréhensions. Tu es mon pilier, ma vie, mon tout.

Avant-propos

Notes introductives et contribution

La réalisation de cette thèse de doctorat en cotutelle a été partagée entre le laboratoire de Nutrition et Neurobiologie Intégrée (NutriNeuro, INRA UMR 1286) à Bordeaux, France et le laboratoire du Dr Frédéric Calon, au Centre de Recherche du CHU de Québec, Axe Neurosciences.

Les organismes subventionnaires ayant permis la réalisation de cette thèse sont : la Région Aquitaine, l'école d'ingénieurs Bordeaux INP, le FRQS et le LIA OptiNutriBrain.

La première partie de cette thèse est une revue de la littérature qui vise à introduire les travaux de cette thèse de doctorat. Le chapitre I ne sera pas soumis à publication en l'état. Le chapitre II est présenté sous forme d'article en cours de soumission. La dernière partie constitue une discussion générale sur l'ensemble des travaux de cette thèse.

Chapitre 1 : Étude des effets préventifs d'un régime enrichi en vitamine A sur la pathologie amyloïde induite par l'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅.

Biyong E.F., Dumetz F., Alfos S., Calon F., Pallet V.

Données préliminaires non soumises à publication.

J'ai réalisé la conceptualisation et l'élaboration de ce projet sous la supervision du Dr Calon et du Dre Pallet. Dumetz F m'a aidé dans la réalisation de certaines expériences qui ne sont pas toutes présentées dans le chapitre (Western-Blot, dosage de l'AR). Alfos S a participé au dosage de la vitamine A plasmatique. J'ai effectué l'intégralité des tests comportementaux, des prélèvements sanguins et des PCRs ainsi que l'analyse des résultats, la préparation des figures et la rédaction de l'article. J'ai réalisé l'interprétation des résultats et leur mise en forme sous la supervision du Dre Pallet.

Chapitre 2 : Étude des effets préventifs d'un régime enrichi en vitamine A sur les performances mnésiques et l'évolution de la neuropathologie Alzheimer chez le modèle de souris 3xTg-AD.

Male-specific preventive effect of dietary vitamin A supplementation in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease neuropathology.

Biyong E.F., Tremblay C., Leclerc M., Caron V., Alfos S., Helbling J.C., Émond V., Pallet V*, Calon F*. (*co-derniers auteurs).

En cours de soumission.

J'ai réalisé la conceptualisation et l'élaboration de ce projet sous la supervision du Dr Calon et du Dre Pallet. Tremblay C a réalisé les dosages des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂. Leclerc M et Caron V ont pesé les animaux et le régime pendant les semaines qui ont précédé mon arrivée au laboratoire du Dr Calon à Québec. Alfos S a contribué au dosage de la vitamine A plasmatique des animaux. Helbling J.C. a participé à la réalisation des PCRs. Émond V. a supervisé et participé au bon déroulement logistique du projet pendant la période intermédiaire entre mon départ du laboratoire de Bordeaux et mon arrivée au laboratoire de Québec. J'ai effectué l'ensemble des tests comportementaux, des prélèvements sanguins, des Western Blot et les PCRs avec la contribution de Helbling J.C. J'ai réalisé l'analyse des résultats, la préparation des figures et la rédaction de l'article ainsi que l'interprétation des résultats et leur mise en forme sous la supervision du Dre Pallet et du Dr Calon.

Publications non incluses dans la thèse :

Retinoic acid increases glucocorticoid receptor phosphorylation via cyclin-dependent kinase 5.

Brossaud, J., Roumes, H., Helbling, J.-C., Moisan, M.-P., Pallet, V., Ferreira, G., **Biyong, E.F.**, Redonnet, A., & Corcuff, J.-B. (2017) Mol. Cell. Neurosci, 82, 96–104.

Dietary vitamin A protects specifically hippocampus-dependent memory from juvenile high-fat-high-sugar (HFHS) diet-induced alterations by a modulation of the gut-brain axis in mice.

Biyong E.F., Janthakhin Y., Alfos S., Dumetz F., Helbling J.C., Urrutia M., Patterson E. Murphy K., Stanton C., Schellekens H., Cryan J. F., Layé S., Capuron L., Moisan M. P., Pallet V., Ferreira G. En préparation pour soumission.

Introduction

A. La vitamine A

I. Absorption de la vitamine A

a) Sources de vitamine A

La vitamine A, de son nom chimique le rétinol-tout-trans (ou simplement rétinol), est une vitamine liposoluble vitale que l'organisme peut se procurer uniquement dans l'alimentation. Dans les aliments d'origine végétale, ce sont les précurseurs de la vitamine A, les caroténoïdes, que l'organisme peut transformer de façon à répondre à ses besoins en vitamine A.

Les caroténoïdes sont des pigments de couleurs très variables allant du jaune pâle au rouge intense, produits par les plantes, les algues ou encore certains micro-organismes tels que des bactéries, des champignons ou des levures (Namitha & Negi, 2010; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016). Leurs multiples fonctions couvrent des propriétés anti-oxydantes, détoxifiantes ou encore ils contribuent à préserver le processus de photosynthèse des plantes (Namitha & Negi, 2010). Il existe plus de 800 caroténoïdes, mais seuls certains d'entre eux (environ 10%) sont précurseurs de la vitamine A, dont l' α -carotène, le β -carotène, le γ -carotène ou la β -cryptoxanthine (Harrison, 2005; Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018). Le β -carotène est le précurseur le plus abondant et le plus efficace en termes de rendement pour produire de la vitamine A (Harrison *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Il a été estimé qu'entre 6 et 12 μg de β -carotène sont nécessaires pour former 1 μg de rétinol, selon sa biodisponibilité dans un aliment donné (Haskell, 2012; Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018).

Le β -carotène donne sa couleur aux carottes, à la patate douce, au melon ou encore à la citrouille, faisant de ces aliments des sources importantes de vitamine A pour l'Homme (Harrison, 2012; Li *et al.*, 2014). Il est à noter que dans l'ensemble des caroténoïdes ingérés par l'organisme, tous n'ont pas vocation à former de la vitamine A (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016)

Dans les aliments d'origine animale, c'est sous forme de rétinol estérifié que la vitamine A est consommée (palmitate de rétinyle principalement). La forme estérifiée du rétinol est sa forme de stockage et de transport après absorption intestinale chez les animaux comme chez l'Homme. Ainsi, les animaux qui ont consommé des caroténoïdes, les métabolisent en esters de rétinol. C'est sous cette forme estérifiée que le rétinol est consommé dans les produits d'origine animale (beurre, thon ou bien encore le foie de morue ou de veau, par

exemple), le foie étant l'organe de stockage de la vitamine A (Blomhoff & Blomhoff, 2006; Harrison, 2012; Li *et al.*, 2014; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016).

Dans les pays en développement, jusqu'à 90% des apports en vitamine A proviennent des caroténoïdes, tandis que dans les pays développés, les trois quarts des apports nutritionnels en vitamine A proviennent d'esters de rétinol d'origine animale ou issus de la fortification alimentaire, un procédé qui consiste à enrichir les aliments en micronutriments après transformation tels que le lait, le beurre ou les céréales du petit-déjeuner (Blomhoff & Blomhoff, 2006; Penniston & Tanumihardjo, 2006).

b) Apports de vitamine A recommandés

La vitamine A, quelle que soit sa forme, se quantifie en « équivalent rétinol » (ER) qui correspond à un microgramme (μg) de rétinol, 6 μg de β -carotène et 12 μg d'autres caroténoïdes provitaminiques A (Buhling & Laakmann, 2014).

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) utilise l'ER pour définir les recommandations d'apport en vitamine A. Les recommandations actuelles préconisent chez l'adulte, un apport de 750 ER/jour pour les hommes et 650 ER/jour pour les femmes (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2015). Au Canada, ces recommandations sont plus élevées (900 ER/jour pour les hommes et 700 ER/jour pour les femmes) et le restent chez les personnes âgées (Santé Canada, 2010), tandis qu'elles sont diminuées chez les sujets de plus de 75 ans en Europe. Chez la femme enceinte, les recommandations en vitamine A sont plus élevées (700 ER/jour, EFSA) de façon à couvrir les besoins du fœtus en plus de ceux de la mère.

En France, chez les adultes âgés entre 18 et 65 ans, la consommation moyenne de vitamine A enregistrée est de 978 ER/jour pour les hommes et 979 ER/jour pour les femmes (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA), 2015), (voir Tableaux 1 et 2).



Dietary Reference Values for vitamin A

Appendix E. Vitamin A intake in males in different surveys according to age classes and country ($\mu\text{g RE/day}$)

Age class	Country	Survey	n	Average	P5	P50	P95
18 to < 65 years	Finland	FINDIET2012	585	1 078	325	867	2 154
	France	INCA2	936	978	279	747	2 068
	Ireland	NANS_2012	634	1 023	356	891	1 864
	Italy	INRAN_SCAI_2005_06	1 068	984	345	750	1 924
	Netherlands	DNFCS 2007-2010	1 023	1 097	340	858	2 662
	Sweden	Riksmaten 2010	623	995	311	880	2 005
	United Kingdom	NDNS-RollingProgrammeYears1-3	560	930	268	768	1 847

Tableau 1 – Valeurs de référence de la consommation quotidienne de vitamine A (rétinol) chez les hommes adultes.

Appendix F. Vitamin A intake in females in different surveys according to age classes and country ($\mu\text{g RE/day}$)

Age class	Country	Survey	n	Average	P5	P50	P95
18 to < 65 years	Finland	FINDIET2012	710	960	312	799	710
	France	INCA2	1 340	979	301	713	1 340
	Ireland	NANS_2012	640	897	319	765	640
	Italy	INRAN_SCAI_2005_06	1 245	885	322	708	1 245
	Latvia ^(b)	FC_PREGNANTWOMEN_2011	990 ^(b)	1 319	375	886	990
	Netherlands	DNFCS 2007–2010	1 034	906	268	690	1 034
	Sweden	Riksmaten 2010	807	958	379	854	807
	United Kingdom	NDNS-RollingProgrammeYears1-3	706	891	266	697	706

EFSA Journal 2015;13(3):4028

78

Tableau 2 – Valeurs de référence de la consommation quotidienne de vitamine A (rétinol) chez les femmes adultes.

Tandis que dans les pays développés, les besoins en vitamine A sont largement couverts, la carence en vitamine A est extrêmement répandue dans les pays les moins riches (Fig. 1) et cause des millions de décès chaque année (Sommer *et al.*, 2002; World Health Organization, 2009). La carence est diagnostiquée lorsque la concentration sérique de rétinol est inférieure à $0,70 \mu\text{mol/L}$ (West, 2003; Stevens *et al.*, 2015) (contre $2 \mu\text{mol/L}$ en conditions normales (Li *et al.*, 2014)), et est associée à de nombreux problèmes de santé tels que la xérophtalmie, un risque important d'infection, des retards de croissance, conduisant finalement à une mortalité accrue (West, 2003). 140 millions d'enfants d'âge préscolaire et plus de 7 millions de femmes enceintes sont estimés atteints de cette carence (Sommer *et al.*, 2002), principalement en Asie du Sud et en Afrique sub-saharienne (Stevens *et al.*, 2015) (Fig. 1). La carence en vitamine A pendant la grossesse provoque de graves malformations chez le fœtus telles que l'anophtalmie (absence d'yeux), la microcéphalie (taille anormalement petite de la tête en raison d'un manque de croissance du cerveau et/ou du crâne, ou encore le *spina bifida* (Maden, 2002).

La plupart des pays en développement ne produisent, ni ne consomment suffisamment de plantes, fruits et légumes riches en β -carotène leur permettant de couvrir leurs besoins en vitamine A (Sommer *et al.*, 2002). Cependant, la carence en vitamine A connaît un recul significatif dans les pays à bas revenus depuis les trente dernières années (Stevens *et al.*, 2015).

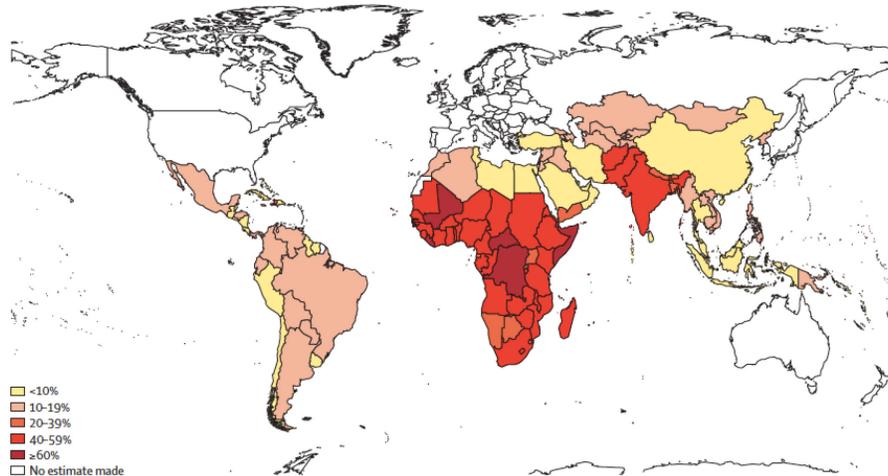


Figure 1 – Prévalence de la carence en vitamine A estimée chez les enfants âgés de 6 mois à 5 ans en 2013.

(Stevens et al. 2015)

La vitamine A (sous forme de rétinol ou d'esters de rétinol) est aussi très souvent quantifiée en utilisant l'unité internationale (UI). Autrefois, cette unité était utilisée par les instances de recommandations nutritionnelles, mais elle a été délaissée au profit des ER. Les UIs sont utilisées pour toutes les vitamines, et sont déterminées indépendamment pour chacune. C'est le Comité de Standardisation Biologique de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui se charge de définir arbitrairement, pour une molécule donnée, la valeur de son unité internationale propre, sur la base de différentes expériences. Dans l'alimentation, une UI de rétinol correspond à 0,33 µg de rétinol (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2017).

c) Digestion de la vitamine A

La disponibilité des caroténoïdes dans les aliments ingérés est limitée, seuls 5 à 30% des caroténoïdes parviendraient à être absorbés par l'organisme (Saura-Calixto & Pérez-Jiménez, 2018) Les caroténoïdes sont absorbés par les entérocytes puis sont métabolisés en rétinol dans la cellule intestinale par la β -carotène-15,15'-monooxygénase (BCMO1). Ils peuvent aussi rester sous forme caroténoïde, car de nombreux tissus possèdent la BCMO1 (O'Byrne & Blaner, 2013).

Les esters de rétinol ne peuvent pas être absorbés tels quels par les entérocytes, ils doivent préalablement être hydrolysés en rétinol libre (O'Byrne & Blaner, 2013). Ce sont les Rétinol-Esters-Hydrolases (REHs) qui sont en charge de cette étape. Elles se trouvent libres

dans la lumière intestinale ou bien accrochées aux microvillosités de la paroi intestinale. La principale REH responsable de la dé-estérification des esters de rétinol est la lipase pancréatique des triglycérides (PTL), mais la Lipase des Esters Carboxyliques (CEL) et la phospholipase B peuvent aussi réaliser cette tâche (Harrison, 2012; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016; Saeed *et al.*, 2017).

La présence de REHs dans la lumière intestinale n'est pas la seule condition nécessaire à l'absorption du rétinol. En effet, la vitamine A est une vitamine liposoluble et elle est de ce fait digérée comme les lipides pour être absorbée par l'organisme. Par conséquent, l'efficacité de son captage dans l'alimentation est significativement augmentée lorsque le contenu gastrique est riche en lipides alimentaires (Iqbal & Hussain, 2009; Harrison, 2012). Notamment, étant donné qu'elle est hydrophobe alors que la lumière intestinale est un environnement hydrophile, la coopération des sels biliaires présents dans la bile est, comme pour les lipides, nécessaire à son absorption (Saeed *et al.*, 2017). Brièvement, les hépatocytes produisent des sels biliaires qu'ils relâchent dans la bile, avant qu'elle ne rejoigne la lumière du duodénum, la partie initiale de l'intestin grêle. La bile contient des phospholipides, du cholestérol, des ions et de l'eau, mais ce sont les sels biliaires qui lui permettent d'émulsionner les lipides et les nutriments lipophiles provenant de l'alimentation, tels que la vitamine A. Des micelles mixtes se forment et incorporent les esters de rétinol afin de leur permettre d'être pris en charge par les lipases. De plus, l'activité de la PTL et de la CEL est accrue en présence de sels biliaires. Ainsi, toute pathologie qui perturbe l'homéostasie des sels biliaires est susceptible d'induire des déficits de vitamine A (Iqbal & Hussain, 2009; Saeed *et al.*, 2017).

d) Transport de l'entérocyte à l'hépatocyte

Une fois dé-estérifié et libre, le rétinol entre dans l'entérocyte grâce à un transporteur, lorsque la concentration du rétinol dans la lumière intestinale se trouve dans des valeurs physiologiques (<150 nM) (Harrison, 2012). Lorsque cette concentration dépasse 300 nM, ce transporteur est saturé, et un transport passif par diffusion à travers la bicouche lipidique des entérocytes prend le relais. L'identité et le fonctionnement exact de ce système saturable demeurent peu connus (Li & Tso, 2003; Saeed *et al.*, 2017).

Aussitôt entré dans l'entérocyte, le rétinol libre est pris en charge par la protéine de liaison cellulaire du rétinol de type II (CRBP_{II}), qui le fournit à la lécithine:rétinol acyl transférase (LRAT) afin qu'il soit ré-estérifié avec des acides gras à longues chaînes (du palmitate, le plus souvent) (Harrison, 2005; Blomhoff & Blomhoff, 2006). C'est sous cette

forme estérifiée que le rétinol quitte l'entérocyte pour rejoindre le foie où il est stocké. Pour ce faire, le rétinol très hydrophobe nécessite d'être transporté par des chylomicrons (CMs).

Les CMs appartiennent aux lipoprotéines, qui sont des complexes formés de protéines et de lipides spécialisés dans le transport de lipides partout dans l'organisme. La synthèse des CMs a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) des entérocytes, et débute par l'assemblage de phospholipides, de cholestérol libre et estérifié, et de triacylglycérols avec la volumineuse apolipoprotéine B48 (apoB48) pour former un pré-chylomicron (Iqbal & Hussain, 2009; Hussain, 2014). En parallèle, les lipides alimentaires ainsi que les vitamines liposolubles fraîchement captés dans la lumière intestinale sont également acheminés dans le RE grâce à leurs protéines de liaison cellulaires respectives (CRBP II dans le cas du rétinol), afin d'être incorporés au cœur du pré-chylomicron en formation (Fig. 2). L'assemblage de ce pré-chylomicron est dépendant de la concentration de lipides absorbés. En effet, l'apoB48 est produite de façon constitutive dans le RE, mais seul un apport suffisant en lipides alimentaires à l'intérieur du RE permet de stabiliser le pré-chylomicron et d'empêcher la dégradation de l'apoB48 par la voie ubiquitine-dépendante. Ceci explique pourquoi l'efficacité d'absorption de la vitamine A augmente avec la co-ingestion de lipides (Iqbal & Hussain, 2009; D'Ambrosio *et al.*, 2011; Hussain, 2014).

Les CMs sont de forme sphérique, dont le cœur contient les lipides alimentaires et dont la surface est majoritairement composée de phospholipides et de cholestérol libre. Ils terminent leur maturation dans l'appareil de Golgi, puis sont transportés jusqu'à la membrane basolatérale de l'entérocyte, avant d'être exocytés à travers la *lamina propria* pour rejoindre le système lymphatique (Tso & Balint, 1986; Iqbal & Hussain, 2009; Mansbach & Siddiqi, 2010; Hussain, 2014).

La sécrétion des CMs chargés en lipides, dans les chylifères (capillaires lymphatiques situés à l'intérieur des microvillosités intestinales) résulte d'un processus actif bien régulé et soutenu par une activité contractile des cellules musculaires lisses qui entourent ces chylifères (Cifarelli & Eichmann, 2019). Le débit de la lymphe, dans lesquels les CMs sont transportés, influence la vitesse de sécrétion des CMs dans les chylifères (Tso & Balint, 1986). Ainsi, la formation et la sécrétion des CMs sont les étapes limitantes de l'absorption de rétinol (Li & Tso, 2003; D'Ambrosio *et al.*, 2011).

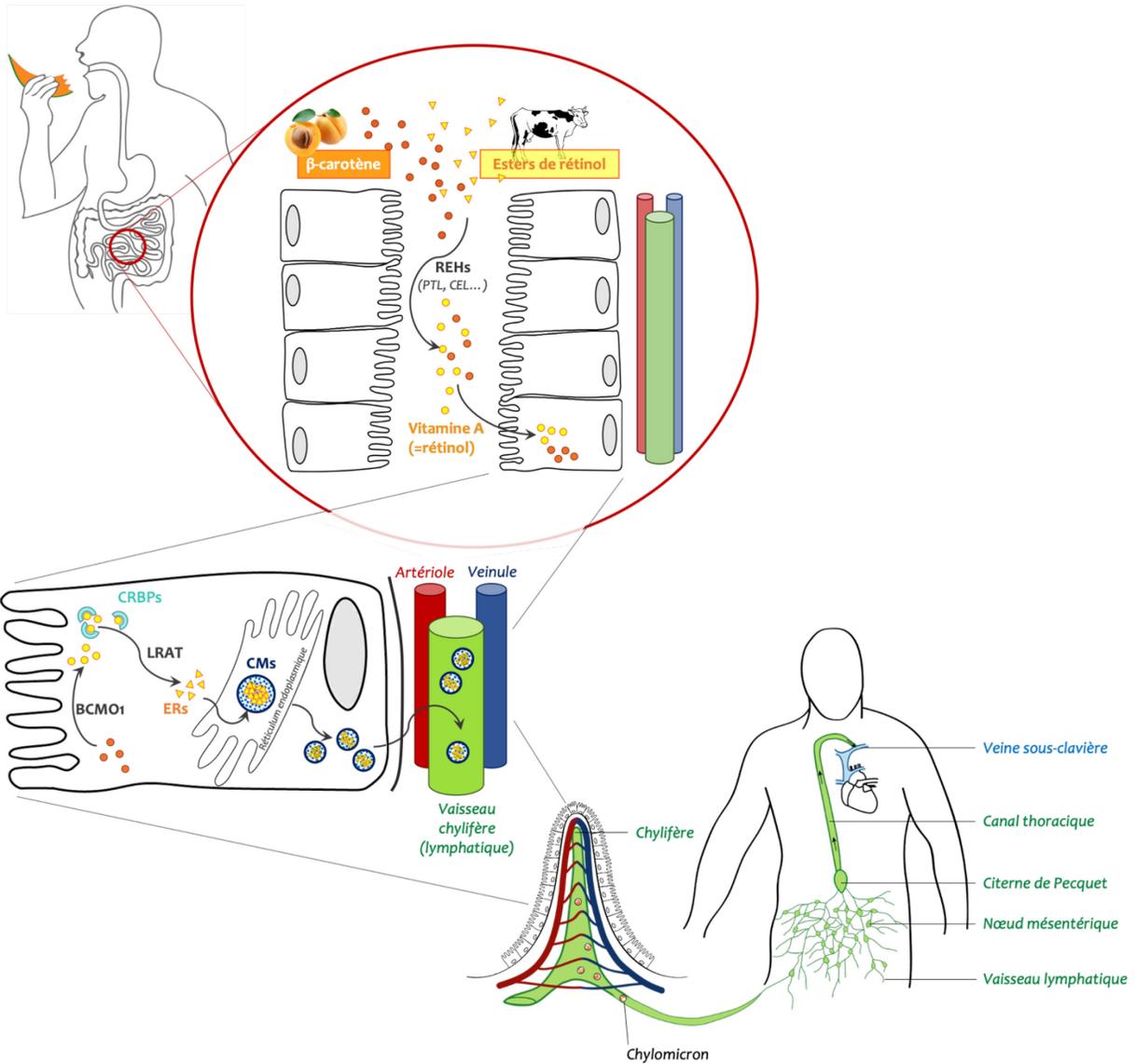


Figure 2 – Absorption de la vitamine A.

Le β -carotène (origine végétale) est absorbé par l'entérocyte sous sa forme caroténoïde et n'est transformé en vitamine A (rétinol) qu'une fois dans l'entérocyte par la BCMO1. Les ERs ingérés (origine animale) sont hydrolysés par les REHs dans la lumière intestinale, ce qui forme du rétinol libre qui peut entrer dans les entérocytes. Une fois dans l'entérocyte, le rétinol est pris en charge par les CRBPs, qui le fournissent à la LRAT, en vue de son estérification. Les ERs formés sont incorporés aux CMs dans le réticulum endoplasmique. Puis après avoir subi leur maturation, les CMs chargés en ERs sont excrétés dans les capillaires lymphatiques appelés chylifères. Ces chylifères rejoignent les vaisseaux lymphatiques convergeant vers la citerne de Pecquet par l'intermédiaire des nœuds mésentériques. Enfin, après avoir emprunté le canal thoracique, les CMs rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière. Une fois dans la circulation générale, les CMs pourront être captés par le foie dans le but de stocker leur contenu en ERs.

Abbreviations : BCMO1, β -carotène-15,15'-monooxygénase 1 ; CEL, Carboxyl Ester Lipase ; CMs, chylomicrons ; CRBPs, Cellular Retinol Binding Proteins ; ERs, esters de rétinol ; LRAT, Lecithin:Retinol Acyl Transférase ; PTL, Pancreatic Tryglyceride Lipase ; REHs, Retinol Ester Hydrolases.

Les CMs voyagent alors le long des nœuds lymphatiques mésentériques jusqu'aux vaisseaux lymphatiques, qui convergent vers la citerne de Pecquet située dans l'abdomen, rejoignent le canal thoracique qui se déverse dans la circulation sanguine au niveau de la veine sous-claviaire supérieure (Cifarelli & Eichmann, 2019) (Fig. 2). Une fois dans la circulation générale, les triglycérides des CMs sont hydrolysés par la protéine lipase et acquièrent l'apolipoprotéine E (apoE) formant ainsi des CMs dits remnants. Environ 70% de ces CMs remnants sont captés par le foie, et permettent à la vitamine A d'être récupérée et stockée par les hépatocytes, contre environ 30% qui échappent à ce stockage et sont captés par divers organes cibles nécessitant de l'utiliser (D'Ambrosio *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

II. Métabolisme général de la vitamine A

a) Stockage de la vitamine A

Le site de stockage principal de la vitamine A est le foie ; la majorité de la vitamine A présente dans l'organisme s'y trouve (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016).

Depuis la circulation sanguine, les CMs traversent l'espace de Disse qui sépare l'endothélium hépatique des hépatocytes, par un processus de tamisage. Le captage des CMs remnants est permis par un récepteur qui reconnaît l'apoE, à la surface des hépatocytes (également appelés cellules parenchymateuses du foie) et conduit à l'internalisation des CMs (D'Ambrosio *et al.*, 2011). Dans l'hépatocyte, les esters de rétinol issus des CMs sont séparés des autres lipides alimentaires et rapidement hydrolysés pour former du rétinol libre, alors pris en charge par la protéine cellulaire de liaison du rétinol de type I (CRBPI). Le devenir du rétinol libre est alors double : (i) il peut être immédiatement associé à son transporteur sanguin spécifique, la protéine de liaison du rétinol appelée la RBP4, produite par l'hépatocyte, pour aller jusqu'à ses tissus cibles. Avant de quitter l'hépatocyte, l'holo-RBP4 (associée au rétinol) s'associe à la transthyrétine (TTR), la protéine de transport de l'hormone thyroïdienne T_4 . Ce complexe rétinol-RBP4-TTR empêche la filtration rénale et l'élimination du rétinol (Li *et al.*, 2014; Vieira & Saraiva, 2014; Khalil *et al.*, 2017). (ii) le rétinol libre est transféré aux cellules étoilées, non parenchymateuses du foie (également appelées cellules de Ito) qui sont spécialisées dans le stockage de la vitamine A (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016).

À ce jour, les mécanismes permettant au rétinol libre de transiter des hépatocytes aux cellules étoilées non parenchymateuses pour son stockage sont mal connus et controversés. Notamment, le rôle de RBP4 pour assurer cette fonction a été évoqué, mais

cette hypothèse a été remise en question après avoir fait le constat que des souris knock-out pour le gène *Rbp4* présentent tout de même des stocks hépatiques d'esters de rétinol comparables à ceux des souris contrôles (Quadro et al., 1999; Vogel et al., 2002).

Cependant, les données actuelles de la littérature s'accordent sur le fait que le rétinol doit être dé-estérifié pour que ce transfert hépatocytes-cellules étoilées soit possible (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016). Une fois dans la cellule de Ito, le rétinol est immédiatement pris en charge par la CRBPI et ré-estérifié avant d'être stocké dans les gouttelettes lipidiques situées dans le cytoplasme (D'Ambrosio et al., 2011; Saeed et al., 2017). Ce stockage se produit lorsque les apports en vitamine A sont conséquents et suffisants. L'organisme peut ainsi y avoir recours dès lors que les apports alimentaires baissent de façon importante pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (D'Ambrosio et al., 2011). Les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées contiennent jusqu'à 50% d'esters de rétinol (palmitate de rétinyle principalement, mais aussi du stéarate de rétinyle, de l'oléate de rétinyle, et du linoléate de rétinyle) (D'Ambrosio *et al.*, 2011; O'Byrne & Blaner, 2013) ce qui représente bien plus que le contenu des gouttelettes lipidiques des hépatocytes, principalement constitué de triglycérides (Blomhoff & Blomhoff, 2006; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016), et justifie leur spécialisation dans le stockage de la vitamine A.

Si la RBP4 ne semble pas indispensable au transfert du rétinol des hépatocytes vers les cellules étoilées, elle serait nécessaire à la mobilisation des stocks des cellules étoilées. En effet, les souris qui n'expriment pas *Rbp4* sont incapables de récupérer le contenu en rétinol des cellules étoilées (Quadro et al., 1999; Vogel et al., 2002). Lorsque des tissus extra-hépatiques présentent un besoin en vitamine A, la mobilisation des stocks hépatiques nécessite à nouveau la dé-estérification des esters de rétinyle en rétinol libre. Celui-ci doit être ramené dans l'hépatocyte, afin de lui permettre de se lier à la RBP4, de former le complexe avec la TTR, et de rejoindre la circulation sanguine et les tissus cibles (D'Ambrosio et al., 2011). L'existence d'un autre récepteur a été mis en évidence chez la souris, nommé RBPR2 pour Récepteur de type 2 de la RBP4. L'expression de RBPR2 est très importante dans le foie et est inversement corrélée aux stocks hépatiques de rétinol. Ainsi, ce récepteur permettrait de favoriser l'entrée du rétinol dans le foie, quand les stocks sont plus faibles. Cependant, l'existence de son homologue chez l'Homme reste à confirmer (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014; Saeed *et al.*, 2017).

Cette capacité du foie à stocker la vitamine A puis à la relarguer à la demande, permet à l'organisme de maintenir de façon extrêmement précise la concentration sanguine de vitamine A (sous forme de rétinol complexé à la RBP4) à une valeur avoisinant 2 μ M chez

l'Homme, et environ 1 μM chez la souris (Blomhoff & Blomhoff, 2006; O'Byrne & Blaner, 2013; Li *et al.*, 2014).

Bien que le foie soit le principal site de stockage de la vitamine A, d'autres organes en sont également capables, mais dans une moindre mesure. C'est le cas des yeux, des poumons, de la peau, des testicules, de la rate ou encore du tissu adipeux (O'Byrne & Blaner, 2013). Le tissu adipeux, en particulier, possède une capacité de stockage non négligeable de la vitamine A. En effet, les adipocytes présentent de nombreuses similitudes avec les cellules étoilées hépatiques : leur morphologie, leurs fonctions et leur équipement enzymatique impliqué dans le métabolisme lipidique et de la vitamine A (Sauvant *et al.*, 2011). Ils sont notamment capables de synthétiser la RBP4 et peuvent stocker des esters de rétinol. Cependant, le dialogue entre ces deux types cellulaires et les moyens éventuels de leur coopération dans le métabolisme de la vitamine A restent à déterminer.

b) Les dérivés de la vitamine A : les rétinoïdes

Les rétinoïdes englobent l'ensemble des molécules naturelles ou synthétiques dérivant du rétinol-tout-*trans* ou bien présentant une ressemblance structurale avec ce dernier (Li *et al.*, 2014) (Fig. 3). Trois parties se distinguent dans la structure de base d'un rétinoïde : un cyclohexane triméthylène (très hydrophobe), conjugué à une chaîne polyénique qui se termine par un groupement fonctionnel polaire (hydrophile) (Chakrabarti *et al.*, 2016; Khalil *et al.*, 2017). La nature de ce groupement polaire détermine le type de rétinoïde ; par exemple si ce groupement est un aldéhyde, le rétinoïde en question est un rétinaldéhyde, si le groupement est un acide carboxylique, le rétinoïde est un acide rétinoïque, et ainsi de suite (Khalil *et al.*, 2017).

La chaîne polyénique est composée de plusieurs doubles liaisons carbone-carbone conjuguées, ce qui rend les rétinoïdes instables. Les carbones présents sur cette chaîne peuvent subir très facilement une oxydation en présence d'agents oxydants, de lumière ou à des températures élevées et induire ainsi la dégradation de ces molécules ou leur isomérisation selon le cas (Blomhoff & Blomhoff, 2006; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016). Ces chaînes polyéniques leur confèrent également une activité chromophore qui leur permettent d'absorber la lumière ultraviolette dans des longueurs d'onde comprises entre 325-380 nm (Chakrabarti *et al.*, 2016).

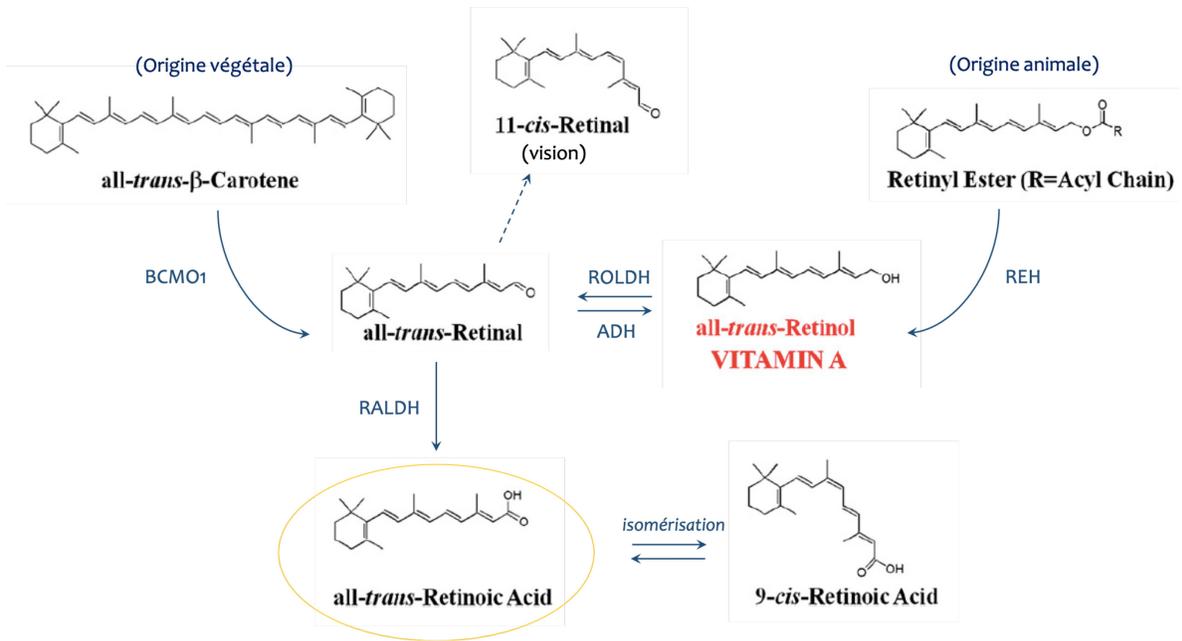


Figure 3 – Les rétinoides et leur précurseur caroténoïde, le β -carotène.

Abbreviations : ADH, Alcool Déshydrogénase ; BCMO1, Beta-Carotene-15,15' Mono-Oxygénase de type 1 ; RALDH, Retinaldéhyde Déshydrogénase, REH, Retinyl Ester Hydrolase, ROLDH, Rétinol Déshydrogénase. Note : « Rétinal » est l'autre nom du rétinaldéhyde. (Adapté de O'Byrne et al. 2013)

c) Métabolisme cellulaire de la vitamine A

De très nombreux organes ont d'importants besoins en vitamine A comme le cerveau, les reins, la rate, les organes génitaux, etc. Lorsque la cellule d'un organe cible de la vitamine A présente un besoin en rétinol, celle-ci le capte dans la circulation sanguine grâce au récepteur STRA6 (STimulated by Retinoic Acid gene 6) présent à la surface de la membrane plasmique, qui lie la RBP4 et facilite ainsi l'entrée du rétinol dans la cellule (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016; Saeed *et al.*, 2017) (Fig. 4). Ce récepteur est exprimé par un grand nombre d'organes présentant des besoins en vitamine A comme le cerveau (Amengual *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2016).

Une fois dans la cellule, le rétinol est immédiatement pris en charge par les protéines de liaison cellulaires du rétinol (CRBPI ou II), qui permettent à la rétinol-déshydrogénase (ROLDH) de le métaboliser pour former le rétinaldéhyde. Ce dernier subit à son tour une déshydrogénation par la rétinaldéhyde-déshydrogénase (RALDH) pour donner naissance à l'acide rétinolique-*tout-trans* (AR), reconnu comme le métabolite actif de la vitamine A. Ce dernier peut être isomérisé en acide rétinolique-*9-cis* (Berbis, 2010). Dans la suite de ce

manuscrit, l'abréviation « AR » fera systématiquement référence à l'acide rétinoïque-*tout-trans*.

Contrairement au rétinaldéhyde, la formation de l'AR est irréversible (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016); une fois produit, il doit être utilisé ou bien dégradé (Saeed et al., 2017). L'AR ainsi formé est alors capté par les protéines de liaison cellulaires de l'AR (CRABPs). Il en existe plusieurs au sein des cellules (CRABP-I, CRABP-II, FABP), et ce sont les besoins de la cellule à un instant donné qui déterminent quelle CRABP doit se lier à l'AR. Les CRABPs acheminent l'AR dans le noyau de la cellule afin qu'il se lie à ses récepteurs, qui sont des facteurs de transcription; les Récepteurs de l'Acide Rétinoïque (RARs) ou bien les Retinoid X Receptors (RXRs). L'AR-*tout-trans* lie uniquement les RARs. L'AR-*9-cis* lie préférentiellement les RXRs, cependant, il n'est pas détectable en conditions physiologiques chez les vertébrés, contrairement au *dihydro-AR-9-cis* qui serait le ligand endogène principal des RXRs (Krezel *et al.*, 2019). La liaison de l'AR induit l'activation de l'hétérodimère RAR-RXR, qui est alors en mesure de réguler la transcription d'une multitude de gènes cibles. Le mode d'action des récepteurs des rétinoïdes est décrit dans la partie ci-après, d) Les récepteurs des rétinoïdes.

À l'inverse, dans le but de réguler finement la concentration d'AR dans la cellule, - d'empêcher son accumulation excessive, ou d'éliminer l'AR excédentaire- les CRABPs peuvent le diriger vers les voies de dégradation, qui sont assurées par les cytochromes P450, famille 26. Il en existe trois isotypes, codés par des gènes différents : CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1, dont la répartition dans l'organisme est variable. Ils dégradent l'AR sous forme de métabolites polaires ; le 4-hydroxy-AR, le 4-oxo-AR ou encore le 18-hydroxy-AR (Berbis, 2010; Ransom et al., 2014) (Fig. 4). Les cytochromes CYP26 sont surtout exprimés dans le foie, mais également dans le cerveau (Thacher *et al.*, 2000; Ross & Zolfaghari, 2011; Stoney *et al.*, 2016). Les métabolites de l'AR subissent par la suite une glucuronidation, pour être excrétés puis éliminés *via* les urines et les fèces (O'Byrne & Blaner, 2013; Blaner, 2019). Il est à noter que bien que les CYP26 sont largement majoritaires dans le catabolisme de l'AR, d'autres familles de cytochromes peuvent également le dégrader (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP1A1, etc.) (Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016). L'AR exerce un rétrocontrôle positif sur sa propre dégradation car les cytochromes CYP26 présentent dans le promoteur de leur gène (Ransom et al., 2014), l'élément de réponse à l'acide rétinoïque (Retinoic Acid Responsive Element, RARE), auquel l'hétérodimère RAR-RXR se lie après fixation de l'AR, et active sa transcription ; un mécanisme précieux pour le maintien de l'homéostasie de la vitamine A.

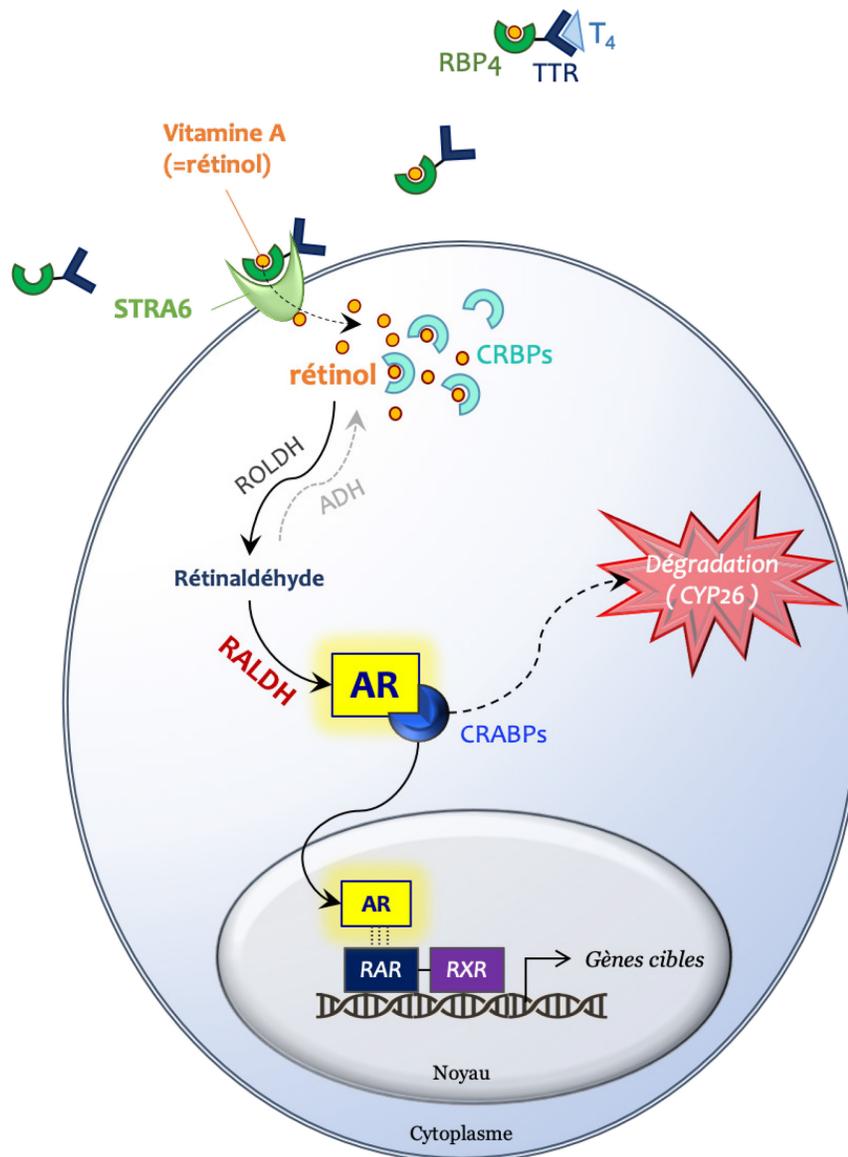


Figure 4 – Métabolisme cellulaire de la vitamine A.

Le rétinol transporté par la RBP4, associée à la TTR entre dans la cellule cible suite à la liaison de RBP4 à STRA6. Dans la cellule, il est immédiatement pris en charge par les CRBPs qui le fournissent à la ROLDH pour une première déshydrogénation donnant naissance au rétinaldéhyde (étape réversible, grâce à l'ADH), qui subit à son tour une déshydrogénation par la RALDH pour former l'AR. L'AR est immédiatement capté par les CRABPs qui l'acheminent dans le noyau pour lui permettre de se lier à ses récepteurs les RARs. Cette liaison permet l'hétérodimérisation de RAR avec RXR et le complexe ainsi formé peut activer la transcription de gènes cibles. Selon le cas, les CRABPs peuvent également diriger l'AR vers les voies de dégradation par les cytochromes CYP26.

Abbréviations : ADH, Alcool Dehydrogenase ; AR, acide rétinolique ; CRABP, Cellular Retinoic Acid Binding Proteins ; CRBP, Cellular Retinol Binding Proteins ; RALDH, Retinaldehyde Dehydrogenase ; RAR, Retinoic Acid Receptors ; RBP4, Retinol Binding Protein 4 ; ROLDH, Retinol Dehydrogenase ; RXR, Retinoid X Receptors ; STRA6, Stimulated by retinoic acid 6 gene ; TTR, Transthyrétine.

d) Les récepteurs de l'acide rétinoïque

Les récepteurs des rétinoïdes, RARs et RXRs, appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (NR) et présentent de ce fait une structure bien caractérisée divisée en domaines ayant chacun leur spécificité, notamment pour la liaison à l'ADN ou bien pour la liaison du ligand (Weikum et al., 2018). Les récepteurs des rétinoïdes sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand (Idres et al., 2002) qui se divisent en trois isotypes de RARs et de RXRs codés par des gènes différents, (RAR α , - β , - γ et RXR α , - β , - γ), à l'intérieur desquels plusieurs isoformes ont été décrites (Lane & Bailey, 2005; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014). L'AR se lie au domaine de liaison du ligand de RAR et induit un changement de conformation de ce dernier, responsable de la perte d'affinité des corépresseurs et du recrutement de coactivateurs de transcription (Tanoury *et al.*, 2013; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014). Ainsi, le complexe AR-RAR-RXR constitué et activé se lie au RARE situé dans le promoteur de ses gènes cibles, et active leur transcription (Lane & Bailey, 2005; Blomhoff & Blomhoff, 2006; Tanoury *et al.*, 2013). Il existe de nombreux polymorphismes des RAREs, mais classiquement ce sont des répétitions du motif AGGTCA, séparés par 1, 2 ou 5 nucléotides (Lane & Bailey, 2005; Tanoury *et al.*, 2013).

Il a été découvert récemment que l'AR peut également se lier à un autre facteur de transcription, le récepteur nucléaire des acides gras, PPAR δ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ , également appelé PPAR β), lorsque son transport cellulaire est assuré par la FABP5, (Tanoury *et al.*, 2013; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014).

Il est à noter que les RXRs possèdent également des ligands qui ne sont pas des rétinoïdes, c'est le cas en particulier de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C20 :6 n-3), un acide gras polyinsaturé de la famille des oméga-3 (de Urquiza *et al.*, 2000; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014). Les RXRs sont capables de former des homodimères ou bien des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires de la superfamille, tels que par exemple, le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur de la vitamine D (VDR), le récepteur des acides gras (PPARs), ou encore le récepteur des acides biliaires FXR (Farnesid X Receptor) (Idres *et al.*, 2002; Lane & Bailey, 2005; Berbis, 2010; Saeed *et al.*, 2017) (Fig. 5).

Pour ajouter à la complexité de la régulation des voies contrôlées par les récepteurs des rétinoïdes, selon le ligand lié au RXR, l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RXR-RN peut varier. Des complexes dits permissifs ou non-permissifs ont été décrits (le Maire *et al.*, 2012; Saeed *et al.*, 2017), et ce qui détermine le caractère permissif d'un complexe RXR-RN n'est pas définitif. Dans le premier cas, les ligands de RXR et de son partenaire peuvent

activer la transcription génique de façon indépendante et synergique. Dans le second cas, RXR n'est qu'un composant structural du complexe, lui permettant simplement de pouvoir se lier à l'ADN.

Plus de 500 gènes sont régulés directement ou indirectement par les récepteurs des rétinoïdes (Balmer & Blomhoff, 2002). L'expression de ces récepteurs est notamment conséquent au niveau cérébral (Krezel *et al.*, 1999; Thompson Haskell *et al.*, 2002; Arfaoui *et al.*, 2013). Ainsi, la voie de signalisation rétinoïde, par l'intermédiaire du RXR, se trouve au confins de plusieurs autres voies de signalisation d'hormones ou d'autres nutriments et est en équilibre avec elles.

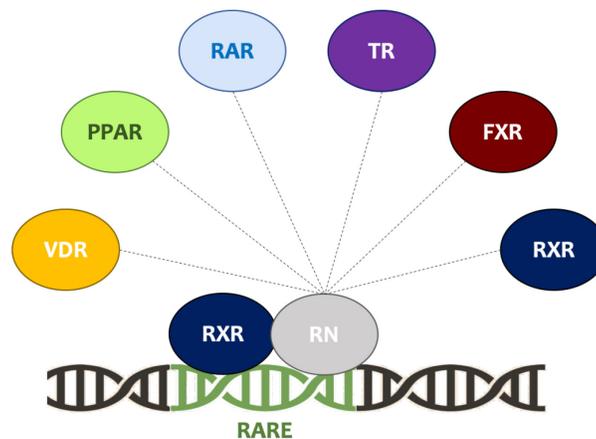


Figure 5 – Hétérodimérisation des RXRs avec d'autres récepteurs nucléaires (RN).

Abréviations : VDR, récepteur de la vitamine D ; PPAR, récepteur des acides gras ; RAR, récepteur de l'AR ; TR, récepteur des hormones thyroïdiennes, FXR, récepteurs des acides biliaires.

e) Co-régulateurs

La régulation de la transcription génique est bien plus complexe que la simple liaison d'un facteur de transcription sur le promoteur d'un gène. En effet, elle intègre la compétition entre les différents ligands d'un même récepteur nucléaire, elle-même dépendant de la présence relative des protéines d'acheminement nucléaire de ces ligands. Il faut aussi prendre en compte la disponibilité nucléaire des partenaires de dimérisation du récepteur, l'efficacité de leur hétérodimérisation, ou encore l'intervention de co-régulateurs qui coordonnent l'accès du récepteur au promoteur d'un gène cible donné.

La capacité de transcription des récepteurs des rétinoïdes est soutenue par des coactivateurs et des corépresseurs qui orchestrent leur activité transcriptionnelle (Blomhoff & Blomhoff, 2006) (Fig. 6).

En absence de ligand, les RARs sont associés à de multiples corépresseurs, dont les principaux sont N-CoR (Nuclear receptor Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors) (Lane & Bailey, 2005). Ces corépresseurs coopèrent avec des facteurs présentant une activité histone-désacétylase (HDAC), qui désacétylent les lysines des extrémités N-terminales des histones et ainsi maintiennent la chromatine dans un état condensé, empêchant l'accès au promoteur du gène cible et donc inhibent la transcription (Tanoury et al., 2013).

Lorsque l'AR se lie au RAR, il induit un changement conformationnel au sein du RAR lui faisant perdre son affinité pour les corépresseurs qui se décrochent et cèdent leur place aux coactivateurs, tels que SRC-1 (également appelé NCoA1), SRC-2 ou encore SRC-3. Ceux-ci font à leur tour appel à une batterie de partenaires possédant, cette fois, une activité d'histone-acétyl-transférase (HAT), d'histone-méthyl-transférase (HMT) ou d'histone-déméthylase (HDM) résultant en la décompaction de la chromatine qui rend disponible le promoteur à la machinerie de transcription génique (Berbis, 2010; Tanoury et al., 2013).

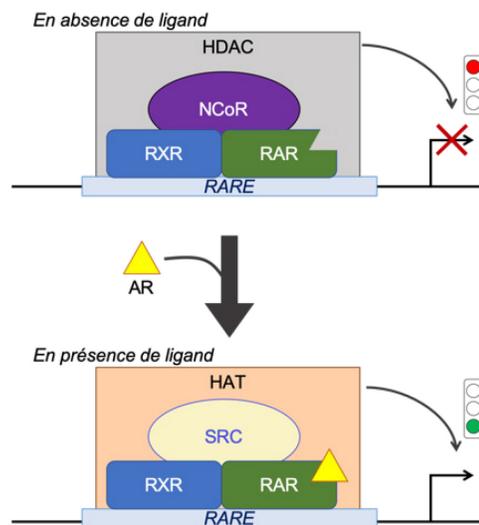


Figure 6 – Interaction des co-régulateurs avec les récepteurs selon la présence d'AR. 3
(Adapté de Lane et al. 20053)

B. Vitamine A et maintien des processus neurobiologiques de la mémoire : conséquences du vieillissement

La vitamine A est probablement la vitamine qui exerce les effets les plus pléiotropes dans l'organisme. Elle est indispensable à la vie *in utero*, jusqu'à l'âge adulte et couvre de très nombreuses fonctions allant de la vision, à la croissance, la reproduction, mais aussi l'immunité (Ross et al., 2000; Semba, 2012), l'hématopoïèse (Cañete et al., 2017), le métabolisme (McIlroy *et al.*, 2013; Mody, 2017; Blaner, 2019) ou encore le maintien de la diversité du microbiote (Cantorna et al., 2019) (Fig. 7).

Cette multifonctionnalité a conduit au développement de pléthore de rétinoïdes synthétiques qui sont actuellement utilisés dans le traitement du lymphome cutané, comme le Bexarotène, agoniste des RXRs ou encore le traitement d'affections topiques telles que le psoriasis, l'acné ou l'eczéma (Khalil et al., 2017).

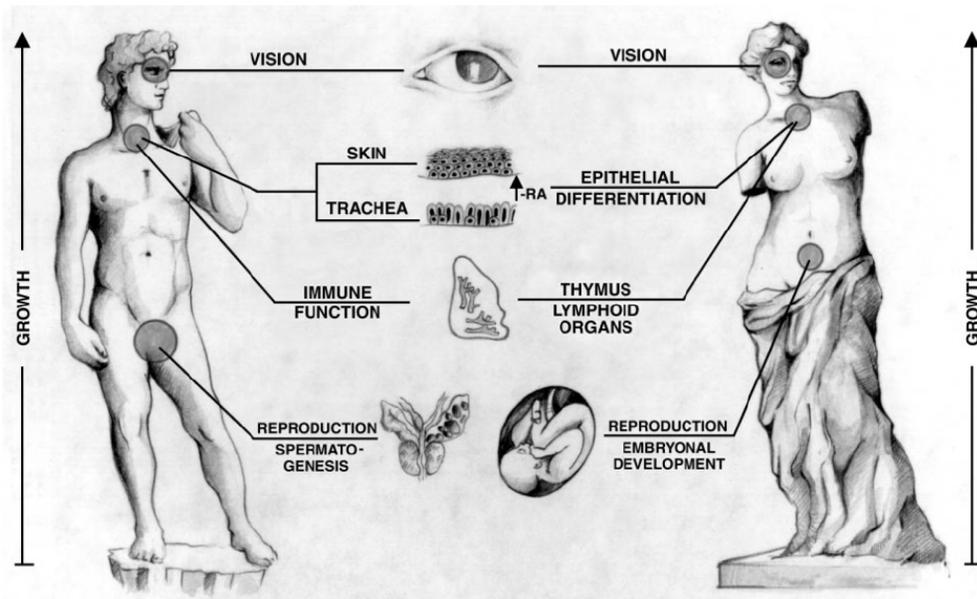


Figure 7 – Représentation non exhaustive des différentes fonctions exercées par la vitamine A dans l'organisme.

(Ross *et al.* 2000)

I. **Fonction de la vitamine A dans le maintien de la mémoire du cerveau adulte**

En complément de ces nombreux rôles, la vitamine A est également primordiale pour le développement du système nerveux central (SNC) au cours de la vie embryonnaire et post-natale, notamment via son effet pro-différenciant sur les cellules neurales progénitrices (McCaffery et al., 2006).

Toutefois, elle conserve un rôle essentiel dans le cerveau l'adulte. De la fin des années 1990 à nos jours, un nombre grandissant d'études ont mis en lumière le rôle de la voie des rétinoïdes dans la fonction cognitive adulte dont la mémoire. Son rôle était jusque-là considéré comme cantonné à la vie *in utero* et au développement post-natal. L'hippocampe en particulier, est une structure cérébrale maîtresse dans la formation et le stockage de différents types de mémoires (Neves et al., 2008; Lisman et al., 2017; Voss et al., 2017) et constitue de ce fait un site privilégié pour l'action de la vitamine A (Krezel et al., 1999; Werner & Deluca, 2002). Le rôle de la vitamine A dans le maintien de la mémoire a été mis en évidence notamment avec l'étude des conséquences de la déplétion génétique des récepteurs de l'AR ou de carence en vitamine A chez le rongeur.

a) **Conséquences cognitives de la déplétion génétique des RARs et RXRs.**

En 1998, Chiang et ses collaborateurs sont parmi les premiers à mettre en lumière le rôle de la voie des rétinoïdes dans la fonction cognitive du cerveau adulte. En étudiant le comportement de souris adultes âgées de trois mois et knock-out pour les récepteurs RAR β , RXR γ ou pour les deux à la fois (RAR β /RXR γ), ils ont mis en évidence une altération des capacités d'apprentissage des souris RAR $\beta^{-/-}$ et RAR β /RXR $\gamma^{-/-}$ dans le paradigme de la piscine de Morris, qui évalue la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe. Les déficits mnésiques de ses souris déficientes étaient associés à une altération importante de la potentialisation à long terme (LTP) et de la dépression à long terme (LTD) (Chiang et al., 1998), deux formes de plasticité synaptique qui assurent le transfert d'informations d'une synapse à une autre et qui font partie des processus à la base de la mémorisation et de l'apprentissage.

En parallèle, les travaux de Krezel et al. montrent que la déficience d'un ou plusieurs récepteurs des rétinoïdes (RAR β , RXR β ou RXR γ) inhibe l'activité exploratoire spontanée de ces souris et altère la transmission dopaminergique mésolimbique impliquée dans le

contrôle de ce comportement (Krezel et al., 1998). Plus tard, des troubles de mémoire de travail à court-terme, se traduisant par des erreurs d'alternance spontanée dans le labyrinthe en Y, ainsi que des troubles de mémoire de reconnaissance à court-terme évaluée dans le test de reconnaissance d'objet ont été mis en évidence chez des souris RAR β /RXR γ -déficientes (Wietrzych et al., 2005).

Des souris transgéniques exprimant un récepteur RAR α dominant-négatif inducible spécifiquement dans le cerveau antérieur, capable de s'hétérodimériser mais pas de se lier à l'ADN pour activer la transcription, présentaient une diminution des réponses synaptiques induites par le récepteur AMPA du glutamate, une altération de la LTP ainsi que des troubles de la mémoire de reconnaissance sociale et de la mémoire spatiale (Nomoto et al., 2012).

Ces travaux, dont la liste n'est pas exhaustive, ayant étudié le rôle spécifique des récepteurs de l'AR, démontrent le rôle crucial de la signalisation de la vitamine A dans les processus de mémoire chez l'adulte.

b) Conséquences cognitives de la carence en vitamine A

La carence en vitamine A est un moyen efficace d'abolir la signalisation de la vitamine A afin d'étudier son rôle sur la cognition chez l'adulte. De la même façon que la déplétion génétique des récepteurs des rétinoïdes, la carence induit des déficits de plasticité synaptique associés à des troubles importants de la mémoire.

La carence en vitamine A conduit à une forte diminution de l'expression des récepteurs RAR β , RXR β et RXR γ dans le cerveau entier des rats (Enderlin et al., 2000). Cette diminution s'accompagne aussi d'une perturbation de la mémoire relationnelle dépendante de l'hippocampe chez la souris (Etchamendy et al., 2003). De plus, la carence en vitamine A perturbe la LTP et la LTD dans la région CA1 de l'hippocampe, chez la souris adulte (Misner et al., 2001). Après 15 semaines de carence, deux jours d'exposition des souris à un régime normalement dosé en vitamine A, de même que le traitement direct de tranches de cerveaux des souris carencées avec de l'AR, permettent de restaurer une plasticité synaptique normale (Misner et al., 2001).

La neurogénèse hippocampique est un processus permettant la naissance de nouveaux neurones dans le but d'enrichir les réseaux de neurones pré-existants et ainsi renforcer la communication neuronale. Il s'agit d'un autre type de plasticité cérébrale soutenant les processus de mémoire. Une altération de la neurogénèse hippocampique a également été rapporté chez le rat carencé en vitamine A associée à une diminution de l'expression des récepteurs des neurotrophines et un déficit de la mémoire spatiale. Toutes ces altérations

ont été normalisées par une supplémentation alimentaire en vitamine A ou l'administration d'AR (Bonnet *et al.*, 2008; Bonhomme, Minni, *et al.*, 2014). Trois jours de consommation d'un régime contrôle (non carencé en vitamine A) permet à des rats carencés depuis 12 semaines de récupérer des performances de mémoire comparables à celles des rats contrôles dans le labyrinthe radial (Cocco *et al.*, 2002).

Cependant, une quantité excessive d'AR dans l'hippocampe peut se montrer délétère. L'administration chronique d'AR-13-*cis*, qui peut s'isomériser en AR, induit chez des souris jeunes et non carencées en vitamine A, une diminution significative de la prolifération neuronale dans l'hippocampe et perturbe la mémoire relationnelle des souris dans le labyrinthe radiaire à huit bras (Crandall *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2012).

À nouveau, ces données ont contribué à révéler le rôle primordial de la signalisation de la vitamine A dans le maintien des processus de mémoire et d'apprentissage chez l'adulte.

c) Mécanismes de maintien de la mémoire par la signalisation de l'AR.

Comme mentionné précédemment, la liaison de l'AR à ses récepteurs nucléaires induit la transcription de nombreux gènes cibles dans le cerveau. Parmi eux, une fraction notable code pour des protéines intervenant dans les mécanismes cellulaires permettant la formation de la mémoire : la neurogranine (RC3) (Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001a), un facteur neurotrophique cérébral (BDNF) (Golini *et al.*, 2012), la neuromoduline (GAP-43) (Husson *et al.*, 2004), la protéine de densité post-synaptique 95 (PSD-95) (Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014), les récepteurs de la dopamine ou encore les récepteurs du neurotransmetteur glutamate ; NMDA, AMPA et kainate (Krezel *et al.*, 1998; Lane & Bailey, 2005), et bien d'autres encore.

De plus, le moment de la journée influencerait l'efficacité de la plasticité synaptique et par conséquent l'efficacité de la formation de la mémoire (Gerstner & Yin, 2010). Le rythme circadien, basé sur un cycle de 24 heures, est généré au sein de l'organisme par le noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus et permet à l'ensemble des tissus de se synchroniser, à l'aide des *zeitgebers*, des signaux environnementaux « donneurs de temps » (par exemple, le jour et la nuit) (Eckel-Mahan & Storm, 2009; Gerstner & Yin, 2010). La signalisation de l'AR serait en mesure d'influencer ce cycle. En effet, les gènes *PER1* et *BMAL1*, véritables métronomes de l'horloge biologique, présentent dans leur promoteur des RARE et RXRE. Trois mois de carence en vitamine A chez le rat modifie significativement

le cycle d'expression de *BMAL1* et abolit la rythmicité d'expression de *PER1* dans l'hippocampe, mais perturbe également l'expression cyclique de BDNF et RC3 (Golini et al., 2012). Les récepteurs des rétinoïdes présentent d'ailleurs eux-mêmes une expression cyclique qui est altérée par la carence en vitamine A (Navigatore Fonzo et al., 2013; Ransom et al., 2014).

Par ailleurs, il existe toute une signalisation non-génomique de l'AR. Une grande partie de ces effets non-génomiques sont impliqués dans les phénomènes de plasticité homéostatique dans le cerveau. Il est primordial de maintenir l'excitation et l'inhibition des synapses dans un bon équilibre pour assurer la stabilité du réseau neuronal et conserver une bonne efficacité de transmission synaptique. Toute modification qui fait pencher de façon durable, la balance dans un sens ou dans l'autre conduit à la mise en place de mécanismes compensatoires pour rééquilibrer cette balance, c'est ce qu'on appelle la plasticité homéostatique, dans laquelle l'AR joue un rôle majeur (Chen et al., 2014).

À titre d'exemple, le RAR α peut se trouver dans le cytoplasme et interagir, via son domaine de liaison du ligand, avec l'ARNm de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA du glutamate, ce qui l'empêche d'être traduit. L'inhibition de cette traduction est levée par la liaison de l'AR au RAR α , et permet à GluR1 d'être exprimée beaucoup plus rapidement que si la transcription de son gène avait dû se produire (Aoto et al., 2008). De même, Sarti *et al.* montrent que l'AR est capable d'augmenter l'endocytose des récepteurs GABA $_A$, ce qui a pour conséquence de réduire l'inhibition de la transmission synaptique de neurones hippocampiques de rat en culture, indépendamment de la présence d'un inhibiteur transcriptionnel (Sarti et al., 2013).

En bref, la signalisation de la vitamine A et par extension, la signalisation de l'AR, module la transcription de gènes impliqués dans la mémoire, l'expression de récepteurs de multiples neurotransmetteurs, régule les processus de plasticité synaptique, la neurogenèse hippocampique, et ainsi contribue au maintien des processus de mémoire dans le cerveau adulte.

II. Le vieillissement cérébral

a) Le vieillissement général

La complexité et la multitude de facteurs qui interviennent dans les processus de vieillissement rendent sa définition difficile. De nombreuses théories ont émergé depuis les années 1960, jusqu'à celle de John Rowe et Robert Kahn qui proposent en 1987 qu'un vieillissement « réussi » réunit les trois éléments suivants ; l'absence de maladie, le maintien d'une bonne condition physique et cognitive et une implication active dans la vie courante (Rowe & Kahn, 1987; Cosco *et al.*, 2017). Cependant, la frontière entre le vieillissement sain et le vieillissement pathologique est ténue et constitue plutôt un continuum. En effet le vieillissement par essence augmente le risque de développer diverses maladies (la Santé, 2016), notamment les maladies neurodégénératives (Hou *et al.*, 2019). De Winter va même jusqu'à considérer que le vieillissement est une maladie en soi, en définissant celle-ci comme un état dans lequel l'organisme rencontre des limitations de ses capacités et de son fonctionnement par rapport à la normale (De Winter, 2015).

Toutefois, le vieillissement peut se définir comme l'ensemble des modifications physiologiques que connaît l'organisme tout au long de sa vie, conduisant au déclin lent et progressif de toutes les fonctions et aboutissant à la mort. C'est un phénomène normal qui doit être distingué de la manifestation de maladies (Rowe & Kahn, 1987). À mesure des avancées de la recherche, les données obtenues à partir d'études transversales et longitudinales ont permis d'assoir le concept de « vieillissement normal ». Ces études ont permis de répertorier l'ensemble des changements se produisant au cours de la vie, comme l'augmentation du temps de réaction après l'âge de 20 ans ou une baisse de la vue et de l'odorat après 40 ans (Carman, 1997; Dziechciaż & Filip, 2014).

Bien que complexe, la définition du vieillissement à l'échelle cellulaire fait intervenir un processus nommé sénescence répllicative.

Le terme « sénescence » réfère à l'arrêt définitif de la prolifération de cellules âgées et/ou endommagées (McHugh & Gil, 2018). La prolifération cellulaire est précédée par une étape de réplication de l'ADN afin d'assurer la même quantité de matériel génétique dans les futures cellules filles. Les télomères, plusieurs répétitions non codantes du motif TTAGGG à l'extrémité des chromosomes (Aravinthan, 2015), assurent l'intégrité et la stabilité de l'extrémité des chromosomes sous l'action d'enzymes appelées les télomérases (McLean & Le Couteur, 2004; Aravinthan, 2015). Contrairement aux cellules germinales, l'activité des télomérases est très limitée voire absente au sein des cellules somatiques (Holt *et al.*, 1997),

ce qui a pour conséquence de raccourcir les télomères à chaque cycle cellulaire (Aravinthan, 2015). À mesure qu'un individu vieillit, les cellules de son organisme se divisent continuellement et voient leurs télomères perdre de 50 à 200 paires de bases à chaque division (McLean & Le Couteur, 2004). En-deçà d'une taille critique, les télomères n'assurent plus la stabilité des extrémités chromosomiques et induisent un arrêt définitif du cycle cellulaire, c'est ce que l'on appelle la sénescence répllicative.

Cependant, des dérèglements qui se produisent au cours du vieillissement physiologique peuvent également induire la sénescence cellulaire tels que des dommages à l'ADN, le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale ou encore l'activation d'oncogènes (McLean & Le Couteur, 2004; Aravinthan, 2015). Les cellules sénescents contribuent à la perte de fonction générale de l'organisme car elles sont résistantes à l'apoptose (Marcotte *et al.*, 2004; Hampel *et al.*, 2005), et s'accumulent de ce fait dans les tissus, réduisant ainsi la capacité de régénération des tissus, en particulier lorsque la sénescence atteint des cellules progénitrices. Ainsi, Kroemer *et al.* 2013 proposent neuf phénomènes cellulaires et



Figure 8 – Marqueurs cellulaires et moléculaires du vieillissement physiologique.

Instabilité génomique, usure des télomères, altérations épigénétiques, perte de protéostasie, dérégulation des senseurs nutritionnels, dysfonction mitochondriale, sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et communication cellulaire perturbée. (Kroemer *et al.* 2013)

moléculaires pour caractériser le vieillissement physiologique (Fig. 8). Pour cela, Kroemer et son équipe se sont basés sur les phénomènes ayant été rapportés dans la littérature comme appartenant aux processus de vieillissement non pathologique, et que l'aggravation expérimentale de l'un de ces phénomènes devrait accélérer le vieillissement, tandis que leur atténuation devrait être associée à un ralentissement du vieillissement (López-Otín et al., 2013).

b) Le déclin cognitif lié à l'âge

Les effets du vieillissement sur le cerveau renvoient inévitablement au déclin lié à l'âge des fonctions cognitives. Les principales fonctions cognitives comprennent la mémoire, les capacités d'attention, le langage ou encore les fonctions exécutives telles que le raisonnement ou la planification (Harada et al., 2013). Non seulement ces fonctions ne sont pas toutes affectées au même rythme, mais l'âge d'apparition des premiers déficits varie d'une personne à l'autre (Mather *et al.*, 2014; Carmona & Michan, 2016), ce qui introduit une importante variabilité interindividuelle et empêche de fixer de façon univoque l'âge de début du déclin cognitif lié à l'âge (Salthouse, 2009). L'alimentation, le stress ou l'activité physique sont des facteurs qui ont une incidence sur la vitesse du déclin cognitif notamment au niveau de l'hippocampe (Jaroudi et al., 2017). Cette variabilité constitue l'un des inconvénients majeurs des études transversales qui comparent les performances cognitives de personnes n'ayant pas été soumises aux mêmes facteurs de vieillissement au cours de leur vie. Les études longitudinales montrent alors leur intérêt puisqu'elles suivent l'évolution de la fonction cognitive des mêmes individus à différentes étapes de leur vie. Cependant, elles présentent le défaut de re-tester plusieurs fois les performances des mêmes sujets, ce qui induit un biais de répétition pouvant masquer des altérations dues au vieillissement (Salthouse, 2009). Tous ces éléments soulignent une fois de plus la difficulté à définir la « normalité » du vieillissement.

D'un point de vue mécanistique, les évènements cellulaires et moléculaires mentionnés précédemment dans la figure 8 interviennent bien entendu au cours du vieillissement du cerveau. Cependant, tout un pan de la recherche en neurosciences s'est attelé depuis des décennies à caractériser les spécificités du vieillissement cérébral responsables de l'affaiblissement des fonctions cognitives avec l'âge, en particulier de la mémoire.

Au cours du vieillissement, le volume du cerveau diminue mais contrairement à une idée préconçue, cette réduction de volume n'est pas associée à une mort neuronale significative (Burke & Barnes, 2006; Harada *et al.*, 2013; Lupo *et al.*, 2019). En revanche, le

vieillesse cérébrale met en cause une importante altération de la morphologie des neurones et de leurs réseaux. Une diminution du nombre, de la densité et de la longueur des épines dendritiques ainsi que le volume des dendrites, a été décrite chez l'Homme, le singe, la souris et le rat (Bohlen und Halbach *et al.*, 2006; Burke & Barnes, 2006; Benavides-Piccione *et al.*, 2013; Coskren *et al.*, 2015; Dumetz *et al.*, 2019). De plus, il semblerait que ce sont les axones des neurones sénescents qui dégèrent, et non leur corps cellulaire, contribuant à diminuer le volume cérébral (Pannese, 2011). Les structures cérébrales qui subissent une réduction notable au cours du vieillissement comprennent certaines zones du cortex et l'hippocampe (Fjell *et al.*, 2014). La diminution de volume de l'hippocampe se produit à l'approche de la soixantaine d'années et se poursuit à mesure que l'âge progresse à raison de 0,8 à 2% de perte par an (Fjell *et al.*, 2014). Ces perturbations morphologiques s'accompagnent d'altérations fonctionnelles. L'excitabilité intrinsèque des neurones de l'hippocampe, c'est-à-dire la propension à générer un potentiel d'action en réponse à des stimuli excitateurs, est modifiée par l'âge chez les rongeurs (Dunn & Kaczorowski, 2019). L'âge induit également un remaniement de la configuration post-synaptique, avec une baisse de la présence des récepteurs du glutamate (NMDA, AMPA), un affaiblissement de l'expression des protéines de densité post-synaptique (PSD-95, synaptophysine, certaines protéines de la famille SNARE), ce qui affecte l'efficacité de transmission synaptique. L'induction de la LTP exige une plus forte stimulation, et le maintien dans le temps de cette LTP est réduit avec l'âge (Fan *et al.*, 2017; Lester *et al.*, 2017). Par ailleurs, une réduction de la quantité de cellules prolifératives dans le gyrus denté, ainsi que des modifications liées à l'âge de la signalisation dans les niches neurogéniques, seraient également à l'origine d'un effondrement de la neurogenèse hippocampique adulte (Spalding *et al.*, 2013; Touyarot *et al.*, 2013; Kempermann, 2015; Fan *et al.*, 2017). Toutefois, cet effondrement de la neurogenèse hippocampique avec l'âge est remis en question chez l'Homme par les travaux de Boldrini *et al.*, qui indiquent que ce phénomène est bien conservé dans le cerveau âgé (Boldrini *et al.*, 2018).

Ainsi toute cette déstabilisation du fonctionnement de l'hippocampe vieillissant se répercute irrémédiablement sur les mémoires qui en dépendent.

Notamment, la mémoire spatiale et la mémoire épisodique dépendent toutes deux de l'hippocampe (Burke & Barnes, 2006; McCaffery *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017; Lisman *et al.*, 2017).

La mémoire spatiale fait référence à la capacité à former et retenir une représentation spatiale mentale. Elle repose notamment sur la symétrie entre les déplacements successifs

de l'individu dans l'espace et l'activation séquentielle de neurones de l'hippocampe appelés « cellules de lieu » (Moser *et al.*, 2015; Lester *et al.*, 2017). Autrement dit, la séquence d'activation de ces cellules dans l'hippocampe suit le déplacement physique de l'individu dans l'espace. Ces cellules de lieu sont présentes chez un grand nombre de mammifères, dont l'Homme et la souris, et coopèrent avec d'autres types de neurones dans le but d'intégrer les informations nécessaires à la formation d'une carte mentale et faciliter la navigation spatiale (Lester *et al.*, 2017). La préservation de cette mémoire est fondamentale pour le maintien de l'indépendance des sujets.

La mémoire épisodique correspond schématiquement à la mémoire de l'expérience personnelle, des souvenirs autobiographiques et retient les informations correspondant aux « où », « quoi » et « quand » (Harada *et al.*, 2013; Tromp *et al.*, 2015).

Ces deux types de mémoire sont altérées au cours du vieillissement normal (Rönnlund *et al.*, 2005; Lester *et al.*, 2017).

III. Effets du vieillissement cérébral sur la voie de signalisation des rétinoïdes

Le rôle fondamental de la signalisation de l'AR dans le maintien de la mémoire hippocampique chez l'adulte d'une part, et le déséquilibre fonctionnel que connaît l'hippocampe au cours du vieillissement d'autre part, interrogent quant à l'état d'activité de la voie de signalisation de l'AR dans le cerveau vieillissant.

En effet, un ensemble de données obtenues chez l'Homme suggère un affaïssement de l'activité de la voie de signalisation de l'AR au cours du vieillissement physiologique. Ces données (récapitulées dans le tableau 3) s'appuient notamment sur une diminution liée à l'âge de la concentration sérique de rétinol ainsi que l'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules mononuclées du sang chez certains sujets (Succari, Garric, Ponteziere, Miocque, & Cals, 1991a; Leotsinidis *et al.*, 2000; Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Brtko *et al.*, 2007). La concentration circulante de rétinol étant bien régulée par le foie, une diminution notable de sa concentration est un reflet de stocks hépatiques particulièrement bas (Tanumihardjo, 2011; 2014; Borel & Desmarchelier, 2017).

Par ailleurs, trois études rapportent une association positive entre la teneur sérique en rétinol et une bonne fonction cognitive (Rinaldi *et al.*, 2003; Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). Le continuum qui réside entre le vieillissement cérébral physiologique et pathologique a conduit à la définition d'un état intermédiaire surnommé le déclin cognitif

léger ou Mild-Cognitive Impairment, MCI, en anglais (Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018). Les sujets dits MCI, présentent le plus souvent une plainte mnésique subjective et objective, mais aucune atteinte mettant en péril l'accomplissement des tâches de la vie quotidienne (Vega & Newhouse, 2014). Toutefois, les performances des sujets MCI, lors de tests cliniques d'évaluation de la fonction cognitive, les différencient des sujets n'ayant aucune altération sans pour autant les assimiler aux sujets atteints de démence (Rinaldi *et al.*, 2003; Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018; Bourassa *et al.*, 2019).

Ainsi, Rinaldi *et al.* 2003 montrent que les sujets MCI ont des niveaux de rétinol plus faibles que les sujets ayant une cognition normale (Rinaldi *et al.*, 2003). Les données de Zeng *et al.* 2017 et Huang *et al.* 2018 indiquent que ces niveaux circulants de rétinol sont statistiquement corrélés à la fonction cognitive (Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018) (Tableau 3).

Cependant, bien que la mesure du rétinol circulant soit largement utilisée pour déterminer le statut en vitamine A chez l'Homme, elle ne donne pas d'indication sur ce qui se produit dans les neurones de l'hippocampe. Dans le cerveau du rongeur vieillissant, l'activité de la voie de signalisation de l'AR est diminuée. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la diminution de l'expression des récepteurs des rétinoïdes, mais aussi de l'expression de leurs gènes cibles tels que RC3 ou GAP43 (Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b; Feart, Mingaud, *et al.*, 2005; Mingaud *et al.*, 2008) (Tableaux 4, 5 et 6). Cette hypoactivité s'accompagne de dérèglements fonctionnels et mnésiques du même ordre que ceux décrits dans la partie précédente c) le déclin cognitif lié à l'âge. En particulier, le vieillissement chez la souris et le rat implique moins de neurogenèse, une efficacité de la LTP abaissée ou encore une activation neuronale réduite en réponse à une stimulation mnésique ayant pour conséquence de perturber les mémoires dépendantes de l'hippocampe (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001a; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013). De plus, Kelly *et al.*, ont montré que chez la souris partiellement KO pour le récepteur Stra6, l'entrée du rétinol dans le cerveau diminuait avec l'âge, et ce d'autant plus chez les souris KO-complet (Kelly *et al.*, 2016). Or, Stra6 possède un RARE dans son promoteur (Laursen *et al.*, 2015; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2016) et est exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique, contribuant à l'entrée du rétinol dans le cerveau (Amengual *et al.*, 2014). En 2019, le lien entre le statut des rétinoïdes à la périphérie et dans le cerveau a été éclairci. En effet, l'étude de Dumetz *et al.* 2019 révèle

que le vieillissement abaisse les niveaux d'AR sérique et hippocampique, qui sont corrélés l'un à l'autre. De plus, la quantité d'AR et de rétinol présents dans le foie sont plus élevés chez les rats âgés comparativement aux jeunes adultes, et l'expression des enzymes impliquées dans le stockage du rétinol, la synthèse et la dégradation de l'AR sont perturbées. Dans l'hippocampe, la quantité d'AR diminuée est concomitante avec une altération de la morphologie dendritique des neurones chez les rats âgés associée à de mauvaises performances de mémoire de reconnaissance spatiale (Dumetz et al., 2019). Ces études ont évalué le potentiel de traitements pharmacologiques à l'AR ou bien de régime enrichi en vitamine A à corriger ces altérations liées à l'âge. De façon intéressante, toutes ces études ont permis de restaurer une concentration de rétinol adéquate, une bonne expression des récepteurs des rétinoïdes, mais aussi de leur gènes cibles, une restauration convenable de la plasticité synaptique et de la maturation des neurones issus de la neurogénèse hippocampique, mais aussi de leur morphologie et enfin les performances mnésiques associées (Enderlin, Alfos, *et al.*, 1997; Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuere, 2001b; Feart, Mingaud, *et al.*, 2005; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Tachibana *et al.*, 2016; Dumetz *et al.*, 2019).

Ensemble, ces données vont dans le sens d'un affaiblissement de la voie des rétinoïdes au cours du vieillissement qui serait un important contributeur au déclin cognitif lié à l'âge. D'autant plus qu'un apport renforcé en vitamine A permet, chez l'animal âgé, de corriger les dérèglements liés à l'âge de la voie de signalisation de l'AR aux niveaux cellulaire, fonctionnel et comportemental, ce qui démontre une fois de plus le rôle fondamental de cette voie dans le bon fonctionnement de la mémoire chez l'adulte. Ainsi, compte-tenu du risque accru de développer des maladies neurodégénératives avec l'âge (Hou et al., 2019), en particulier les sujets MCI, pour lesquels le risque de démence est augmenté, il semble crucial d'identifier les sujets à risque et de développer des stratégies permettant de freiner la spirale du déclin cognitif lié à l'âge.

DONNÉES OBTENUES CHEZ L'HOMME			Référence
Sujets	Traitement	Effets de l'âge sur le statut de la voie de signalisation rétinoléoïde	
160 volontaires sains: 80 adultes : 40 H et 40 F (18-59 ans) 80 âgés : 40 H (66-90 ans) et 40 F (67-99 ans)	S.O.	<ul style="list-style-type: none"> Rétinol circulant, (comparaison aux adultes) : Hommes âgés : ↓ (p<0.04) Femmes âgées : ↓↓↓ (p<0.0001) 	Succari et al. 1991
200 sujets âgés sains (82 H; 112F) provenant de milieu urbain ou rural en Grèce : Total : (75.3 ±7.6 ans) :	S.O.	<ul style="list-style-type: none"> Urbains, dont le rétinol sanguin <0.3 mg/l (= subcarence) : 16.7% des hommes. 26% des femmes. Total = 22% 	Leoutsinidis et al. 2000
81 sujets âgés vivant de façon autonome (Italie) : 41 hommes (76.6 ±7.9 ans) 59 femmes (77.4 ±7.6 ans) 25 MCI (11 H, 14 F) : (75.8 ±4.8 ans). <i>Les MCI présentent une plainte mnésique subjective et ont une mémoire plus mauvaise que la moyenne des gens du même âge. Pas de démence. Fonction cognitive globale normale.</i>	S.O.	<ul style="list-style-type: none"> Ruraux, dont le rétinol sanguin <0.3 mg/l (= subcarence) : 25,4 % des hommes. 20,3% des femmes. Total = 23% 	
46 hommes et femmes volontaires (16 H; 30 F) :	S.O.	<ul style="list-style-type: none"> Rétinol circulant : MCI : ↓↓↓ (p<0.001) par rapport aux contrôles. 	Rinaldi et al. 2003
22 adultes (35.5 ±11 ans) 24 âgés (75 ±6 ans)	S.O.	<p>Sérum :</p> <ul style="list-style-type: none"> Corrélation rétinol-RBP-TTR plus faible chez les sujets âgés. Cellules mononucléées du sang (comparaison aux adultes) : RARY (ARNm) des âgés : ↓ (p<0.05) Corrélation RARY (ARNm) avec le rétinol sanguin perdue chez les plus âgés Corrélation RARY (ARNm) avec le ratio RBP:TTR sanguin perdue chez les plus âgés 	Féart et al. 2005
40 hommes volontaires : 20 jeunes adultes (26 ±4.1 ans) 20 d'âge mûr (65 ±3.8 ans)	Supplémentation à l'AR-13-cis (0,5 mg/kg/j.) de 28 jours.	<ul style="list-style-type: none"> Rétinol : S.E / S.E AR-tout-trans : N.D. / ↑↑ AR-9-cis : N.D. / ↑ AR-13-cis : N.D. / ↑ Cellules mononucléées du sang : RXRβ (ARNm) : ↓↓ (p=0.01) / ↑ (p=0.001) 	Brtko et al. 2007
330 sujets recrutés dans 15 centres de soins aux personnes âgées en Chine: 237 femmes (79.3 ±8.9 ans) 93 hommes (74.5 ±11.9 ans)	S.O.	<p>(1) :</p> <ul style="list-style-type: none"> VAN : 60,9% de la cohorte SC : ↓↓ (p<0.01) vs. VAN (25,8% de la cohorte) C : ↓↓ (p<0.01) vs. VAN et SC (13,3% de la cohorte) <p>(2) :</p> <ul style="list-style-type: none"> N : 41,8% de la cohorte Rétinol sérique : - DL : ↓↓ (p<0.01) vs. N (40% de la cohorte) - DM : ↓↓ (p<0.01) vs. N (18,2% de la cohorte) 	Zeng et al. 2017
(1) répartis en groupes selon leur rétinol sanguin : vit. A normale (VAN), subcarencés (SC), et carencés (C). Ou (2) répartis en groupes selon leur score cognitif : normal (N), déclin léger (DL), déclin modéré (DM)	S.O.	<p>Corrélations du rétinol sérique des sujets :</p> <ul style="list-style-type: none"> Positive avec le MMSE : $r^2=0.176$, $p<0.005$ Le MMSE est un test qui évalue l'état général de la fonction cognitive d'une personne. Plus il est élevé, meilleure est cette fonction. Négative avec l'ADL : $r^2=0.185$, $p<0.005$ L'ADL permet d'estimer l'autonomie d'une personne dans les activités de la vie courante. Plus il est élevé, moins la personne est autonome. Négative avec l'ADAS-Cog : $r^2=0.285$, $p<0.005$ L'ADAS-Cog permet de détecter une démence chez un sujet. C'est un test beaucoup plus sensible que le MMSE. Plus le score obtenu est élevé, plus la démence est sévère. 	
1754 sujets (65.3 ±6.3 ans) recrutés en Chine, vivant de façon autonome : 32% d'hommes, 68% de femmes.	S.O.	<ul style="list-style-type: none"> Rétinol circulant : MCI (n=583) : ↓↓↓↓ (p<0.0001) par rapport aux sujets ayant une fonction cognitive normale. Corrélations positive entre le rétinol sérique de tous les sujets (n=1754) et toutes les performances cognitives mesurées, y compris : • La mémoire : $r^2=0.161$, $p<0.01$ • Le score obtenu au MoCA : $r^2=0.222$, $p<0.01$. Le MoCA est un test similaire au MMSE, plus récent, et présente le même objectif que ce dernier. 	Huang et al. 2018
<p>Abbreviations : ADAS-Cog : Alzheimer's Disease Assessment Scale; ADL : Activities of Daily Living scale; MCI : Mild Cognitive Impairment; MMSE : Mini-Mental State Examination; MoCA : Montreal Cognitive Assessment; N.D. : Non détectable; S.E. : sans effet; S.O. : sans objet.</p>			

Tableau 3 – Récapitulatif des données concernant le statut rétinoléoïde au cours du vieillissement (Homme).

DONNÉES OBTENUES CHEZ L'ANIMAL

Modèle	Expérience / Traitement	Effets du vieillissement seul / Conséquences du traitement rétinolol (vs. traitement contrôlé ou vs. avant traitement)		Fonctionnels	Comportementaux	Référence
		Cellulaires/Moléculaires				
Souris C57BL/6 : Jeunes (3 mois) Âgées (22 mois)	Effets du vieillissement seul (traitement véhicule)	Âgées vs. Jeunes: Cerveau entier (ARNm): RXR ↓ ; RAR ↓ ; RC3 ↓ (p<0.05) (RC3=neurogranine, gène cible de RAR/RXR) Hippocampe (ARNm): RXR ↓↓ ; RAR ↓↓ ; RC3 ↓↓↓ (p<0.01).		S.O.	S.O.	Enderlin et al. 1997 (a)
	Traitement aigu à l'AR des souris âgées uniquement, 12h ou 24h avant euthanasie (sous-cutané, 2 mg/kg).	Âgées traitées à l'AR vs. véhicule: Cerveau entier (ARNm): • AR (12h): RXR ↑, RAR ↑, RC3: N.S (p<0.05) • AR (24h): RXR ↑, RAR ↑, RC3 ↑ (p<0.05) • AR (24h) vs. AR (12h): RXR ↑, RAR ↑, RC3 ↑ (p<0.05)				
Rats Wistar: Jeunes adultes (2, 5 mois) Adultes (6 mois) Âgés (24 mois)	Effets du vieillissement seul (traitement véhicule)	Cerveau entier (ARNm): • Adultes vs. Jeunes: RAR: N.S • Âgés vs. Jeunes: RAR ↓ (-26%) (p<0.05) • Âgés vs. Adultes: RAR ↓ (p<0.05)		S.O.	S.O.	Enderlin et al. 1997 (b)
	Traitement aigu à l'AR ou au palmitate de rétinyle (PR) des rats adultes et âgés uniquement, 24h avant euthanasie (gavage; AR: 5 mg/kg; PR: 13 mg/kg).	Adultes gavés vs. non-gavés Cerveau entier (ARNm): • AR: RAR ↑ (p<0.05) • PR: RAR: N.S Âgés gavés vs. Non-gavés Cerveau entier (ARNm): • AR: RAR ↑ (p<0.05) • PR: RAR ↑ (p<0.05)				
Souris C57BL/6 : Adultes (4-5 mois) Âgées (21-23 mois)	Comportement: Labyrinthe radiaire à 8 bras. Teste la mémoire relationnelle (long-terme) dépendante de l'hippocampe. Traitement à l'AR +/- CD3106, (sous-cutané, AR: 150 µg/kg/jour et CD3106 RXRβ/γ ↓↓ (p<0.05) avant le comportement).	Traitement a. (4 jours) Vieillessement seul: Âgées (véhicule) vs. Adultes: Cerveau entier (ARNm): • RXRβ ↓↓ (p<0.01) • RXRβ/γ ↓ (p<0.05) • RC3 ↓↓ (p<0.01), gène cible de RAR/RXR Hippocampe (ARNm): • RXRβ/γ ↓↓ (p<0.05) • RC3 ↓↓↓ (p<0.01) Traitement: Âgées (AR +/- CD3106) vs. Âgées (véhicule): Cerveau entier (ARNm): • AR: RXRβ ↑↑, RXRβ/γ ↑, RC3 ↑↑ (p<0.01) • AR+CD3106: RARβ; RXRβ/γ; RC3: N.S Hippocampe (ARNm): • AR: RXRβ/γ ↑ (p<0.05), RC3 ↑↑ (p<0.01) • AR+CD3106: RXRβ/γ; RC3: N.S	Traitement b. (25 jours) Vieillessement seul: Âgées (véhicule) vs. Adultes: Hippocampe (ARNm): • RXRβ ↓↓ (p<0.05) • RC3 ↓↓↓ (p<0.01) Traitement: Âgées (AR +/- CD3106) vs. Âgées (véhicule): Hippocampe (ARNm): • AR: RXRβ/γ ↑ (p<0.05), RC3 ↑↑ (p<0.01) • AR+CD3106: RXRβ/γ; RC3: N.S	Plasticité synaptique Vieillessement seul: Âgées (véhicule) vs. Adultes: LTP ↓↓ (Hippocampe) Mémoire: Déficit de mémoire relationnelle chez les souris âgées Âgées (véhicule) vs. Adultes: Choix corrects ↓↓ (p<0.001) Traitement: Âgées (AR +/- CD3106) vs. Adultes: Choix corrects ↑↑↑ (p<0.001) Restauration des performances de mémoire par le traitement à l'AR, via une activation des RAR. Âgées (AR +/- CD3106) vs. Âgées (véhicule): • AR: Choix corrects ↑↑↑ (p<0.001), • AR+CD3106: Choix corrects: N.S		Eichamendy et al. 2001
	2 durées de traitement: a. 4 jours puis euthanasie (évaluation de la LTP). b. 25 jours (début 4j, avant comportement jusqu'à la fin) Note: les souris adultes reçoivent uniquement le véhicule.	Traitement: Une injection d'AR unique (uAR) (par gavage, 5 mg/kg) OU Injections multiples d'AR (mAR) (Intra-péritonéal, 150 µg/kg/jour pendant 4 jours) Note: Les adultes reçoivent uniquement du véhicule.	Vieillessement seul: Cerveau entier (ARNm): • RARβ ↓ (p<0.05) • GAP43 (=neuromoduline, gène cible de RAR/RXR): ↓ (p<0.05) • RC3: ↓ (p<0.05) Traitement (AR): Âgés (uAR et mAR) vs. Âgés (véhicule): ↑ (p<0.05) concernant RARβ et GAP43, mais RC3: p=N.S		S.O.	S.O.

AR: acide rétinololique; LTP: Potentiation à Long-Terme; N.S.: non significatif; PR: palmitate de rétinyle; RAR: Récepteur à l'acide rétinololique; RXR: Récepteur à l'acide rétinololique; RC3: neurogranine; RXR: Récepteur à l'acide rétinololique.

Tableau 4 – Récapitulatif des études ayant montré des améliorations fonctionnelles et comportementales suite à un traitement à base de vitamine A nutritionnelle ou pharmacologique chez l'animal âgé.

DONNÉES OBTENUES CHEZ L'ANIMAL (suite)

Modèle	Expérience / Traitement	Cellulaires/Moléculaires	Fonctionnels	Comportementaux	Référence
<p>Souris C57BL/6 : Adultes (4-5 mois) Mi-âgées (11-12 mois) Âgées (21-23 mois)</p>	<p>Comportement: Labyrinthe radiaire à 8 bras. 2 protocoles : - Test de la mémoire de travail (court-terme) - Test de la mémoire relationnelle (long-terme) Toutes deux dépendantes de l'hippocampe.</p> <p>Traitement: Régime enrichi en vitamine A (Vit.A) à 45UJ/g (contrôle : 5UJ/g) débutant à l'âge de 2 mois.</p> <p>Combiné ou non à : Injections d'AR (AR) (sous-cutané, 150 µg/kg/jour pendant 3 sem.)</p>	<p>Effets du vieillissement seul / Conséquences du traitement rétinolé (vs. traitement contrôle ou vs. avant traitement)</p> <p>Cellulaires/Moléculaires Vieillessement seul (régime contrôle); Hippocampe (ARNm): • RARβ : S.E • GAP43 : ↓ (p<0.05)</p> <p>Traitement (combinaison Vit.A/AR): Âgées (Vit.A +/- AR) vs. Âgées (véhicule); Hippocampe (ARNm): • Vit.A: RARβ : ↑(+39%) et GAP-43 : ↑ (p<0.05) • AR: RARβ : ↑(+30%) • Vit.A+AR : RARβ : ↑(+15%)</p>	<p>Fonctionnels Vieillessement seul (régime contrôle): Déficit d'activation neuronale en réponse à une stimulation mnésique dans le labyrinthe (véhicule): Âgés vs. Adultes (régime contrôle; traitement Hippocampe): • Régions CA1-CA3 Cellules positives pour cFOS : ↓↓ (p<0.01) • Régions DG Cellules positives pour cFOS : N.S</p> <p>Traitement (régime uniquement): Restauration de l'activation neuronale au niveau des jeunes par le régime enrichi: Âgées +Vit.A vs. Adultes (régime contrôle); Hippocampe (ARNm): Vit. A: • Régions CA1-CA3 Cellules positives pour cFOS : N.S • Régions DG Cellules positives pour cFOS : N.S Cortex préfrontal: Cellules positives pour cFOS : N.S.</p>	<p>Comportementaux MÉMOIRE À COURT-TERME Vieillessement seul (régime contrôle, traitement véhiculé): Déficit de mémoire de travail chez les plus âgés seulement: % de choix corrects: • Âgés vs. Adultes (régime contrôle); p=0.003 • Âgés vs. Mi-âgés; p=0.032 • Mi-âgés vs. Adultes : p=N.S Traitement (combinaison Vit.A/AR): Préservation de la mémoire de travail par le régime et l'AR. • Vit.A: protège la mémoire de travail des plus âgés. • AR: protège également mais moins efficacement. • Vit.A+AR : pas d'effet synergique. Suggère que c'est la voie nutritionnelle qui permet de maintenir la meilleure activité de la voie des rétinoïdes MÉMOIRE À LONG-TERME Vieillessement seul (régime contrôle): Déficit de flexibilité de la mémoire relationnelle chez les plus âgés : % de choix corrects: • Âgés vs. Adultes (régime contrôle); p<0.05 Traitement (régime uniquement): Préservation de la flexibilité de la mémoire relationnelle par le régime. % de choix corrects: Âgées +Vit.A vs. Adultes (régime contrôle); P=N.S</p>	<p>Mingaud et al., 2008</p>
	<p>Rats Wistar: Adultes (3 mois) Mi-âgés (13 mois)</p>	<p>Effets du vieillissement seul (régime contrôle)</p> <p>Comportement: Piscine de Morris. Teste la mémoire spatiale (long-terme) dépendante de l'hippocampe. Traitement: Régime enrichi en vitamine A (Vit.A) à 45UJ/g (contrôle : 5UJ/g) pendant 4 mois. Note : les rats adultes reçoivent uniquement le régime contrôle</p>	<p>Rétinol sérique: Âgés vs. Adultes : ↓↓↓ (-41%) (p<0.001) Hippocampe (DG): Âgés vs. Adultes : • Prolifération cellulaire (marqueur Ki-67): ↓↓↓ (p<0.001) • Neuronnes immatures (marqueur DCX): ↓↓↓ (p<0.001)</p> <p>Traitement (régime enrichi): Rétinol sérique: Âgés +Vit.A vs. Adultes : S.E. Hippocampe (DG): Âgés +Vit.A vs. Âgés : • Prolifération cellulaire (marqueur BrdU): ↑↑ (p<0.01) • Neuronnes immatures (marqueurs BrdU/NeuN): ↑↑ (p<0.01)</p>	<p>Mémoire : Déficit de mémoire spatiale chez les rats âgés par le régime enrichi: % de temps dans le quadrant cible: • Neurogenèse hippocampique: ↑↑ (p<0.01) • Maturation des nouveaux neuronnes: ↑↑ (p<0.01) Corrélation positive entre le rétinol sanguin et le nombre de neuronnes matures dans l'hippocampe : r²=0.644; p=0.003</p>	<p>Touyrot et al., 2013</p>

AR: acide rétinolique; DG: Gyrus denté; N.S : non significatif; GAP43 : neuromoduline; RAR: Rétinoïde Acid Receptors; S.E : sans effet; UJ : unité internationale

Tableau 5 – Récapitulatif des études ayant montré des améliorations fonctionnelles et comportementales suite à un traitement à base de vitamine A nutritionnelle ou pharmacologique chez l'animal âgé (suite).

DONNÉES OBTENUES CHEZ L'ANIMAL (fin)

Modèle	Expérience / Traitement	Effets du vieillissement seul / Conséquences du traitement rétinol (vs. traitement contrôle ou vs. avant traitement)			Référence
		Cellulaires/Moléculaires	Fonctionnels	Comportementaux	
Souris C57BL/6 M-âgées (12 mois)	Traitement: Régime enrichi en vitamine A (Vit.A) à 20U/g (contrôle : 5U/g) pendant 2 mois. OU Régime contrôle pendant 2 mois + injections d'AR (sous-cutané, 150 µg/kg/jour pendant 5 jours, débutant 4j. avant le comportement.)	Traitement (AR): Hippocampe (ARNm): • Agées+AR vs. Agées : • RARα : ↓↓ (p<0.001) • RARB : ↑↑↑ (p<0.001) • PSD-95 (gène cible de RAR/RXR) : ↑↑ (p<0.01)	S. O.	Test de discrimination contextuelle en série. <i>Tâche modélisant la mémoire épisodique dépendante de l'hippocampe.</i> Amélioration des performances de mémoire « episodic-like » des souris âgées par le régime enrichi: % de choix corrects comparaison au hasard: • Agées : p=N.S • Agées+Vit.A : ↑↑ (p<0.01) • Agées+AR : ↑↑↑ (p<0.001) % de choix corrects: • Agées+Vit.A vs. Agées: p=N.S • Agées+AR vs. Agées: ↑↑↑ (p<0.001)	Bonhomme <i>et al.</i> , 2014
Souris contrôles des nLRP1-KO Adultes : 3-6 mois Âgées : 20-24 mois	Traitement: Régime enrichi en bêxarotène (Bex) , agoniste spécifique des RXR à raison de 800 µg/g (contrôle : 0µg/g) pendant 2 mois. (Dose de Bex consommée par jour estimée à 100 mg/kg) <i>Note : les souris adultes reçoivent uniquement le régime contrôle</i>	Vieillessement seul (régime contrôle): Cortex (protéines synaptiques.WB): • Agées vs. Adultes : • PSD-95 : ↓ (p<0.05) • GluR1 : ↓ (p<0.05) • NR1 : ↓ (p<0.05) Traitement (Bex): Cortex et Hippocampe (protéines synaptiques.WB): • Agées+Bex vs. Agées : • PSD-95 : ↑ (p<0.05) • GluR1 : ↑ (p<0.05) • NR1 : ↑ (p<0.05) • Synaptophysine : ↑ (p<0.05)	S. O.	S. O.	Tachibana <i>et al.</i> , 2016
Rats Wistar Adultes : 10 sem. Âgés : 16 mois	Traitement: Régime enrichi en vitamine A (Vit.A) à 20U/g (contrôle : 5U/g) pendant 4 semaines.	Vieillessement seul (régime contrôle): • Agées vs. Adultes : Sérum et Hippocampe: • Rétinol : ↓ (p<0.05) • AR : ↓ (p<0.05) Foie: • Rétinol : ↑ (p<0.05) • AR : ↑ (p<0.05) • Métabolisme : altéré Traitement (Vit.A): • Agés +Vit.A vs. Agés : Sérum et Hippocampe: • Rétinol : ↑ (p<0.05) • AR : ↑ (p<0.05) Foie: • Rétinol : S.E • AR : S.E • Métabolisme : normalisé	Vieillessement seul (régime contrôle): • Agées vs. Adultes : Hippocampe: • Morphologie dendritique des neurones pyramidaux : ↓ (p<0.05) Traitement (Vit.A): • Agés +Vit.A vs. Agés : Hippocampe: • Morphologie dendritique des neurones pyramidaux : ↑ (p<0.05)	Vieillessement seul (régime contrôle): Labyrinthe en Y en 2 sessions. <i>Tâche modélisant la mémoire épisodique spatiale dépendante de l'hippocampe.</i> Altération de la mémoire de reconnaissance spatiale: Temps passé dans le bras nouveau pas différent des autres bras Traitement (Vit.A): Restauration de la mémoire de reconnaissance spatiale: Agés +Vit.A : Temps passé dans le bras nouveau supérieur aux autres bras	Dumetz <i>et al.</i> , 2019

AR: acide rétinolique; N.S : non significatif; PSD-95 : Post-Synaptic Density protein 95; RAR: Retinoic Acid Receptors; RXR: Retinoid X Receptors; S.E : sans effet; UI : unité internationale; WB : Western Blot

C. La vitamine A dans la prévention de la maladie d'Alzheimer

I. La maladie d'Alzheimer

a) Le déclin cognitif léger (MCI) : un état précurseur de la MA

Le déclin cognitif léger ou MCI, défini comme intermédiaire entre le déclin cognitif normal et pathologique, est une période charnière pour le basculement dans la démence, ou l'éventuel retour à une cognition normale. De nombreux facteurs liés à l'hygiène de vie ou à la santé générale des sujets influencent la vitesse de progression de cet état pré-dément à la démence (Campbell *et al.*, 2013; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018). Des sous-types de MCI ont été définis dans le but de mieux caractériser le risque de développer une démence d'une part, et quel type de démence d'autre part (Campbell *et al.*, 2013; Petersen, 2016). En effet, le statut MCI conduit préférentiellement au développement de la maladie d'Alzheimer (MA), mais peut aussi déboucher sur d'autres types de démences (Campbell *et al.*, 2013; Vega & Newhouse, 2014).

Plusieurs définitions des sous-types de MCI ont été proposées sur la base de l'observation de biomarqueurs et du type de fonction cognitive altérée (Vega & Newhouse, 2014), mais toutes s'accordent sur la cooccurrence des éléments suivants pour définir le statut MCI : (i) une plainte cognitive subjective ; (ii) au moins une fonction cognitive altérée objectivement ; (iii) le déroulement normal des activités de la vie quotidienne, en toute autonomie, (iv) l'absence de démence (Vega & Newhouse, 2014; Petersen, 2016).

L'atteinte de la mémoire du sujet MCI plutôt qu'une autre fonction cognitive, fait de lui un MCI dit amnésique, et est très fortement liée au risque de développer la MA (Petersen, 2016; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018). Toutefois, pour confirmer une évolution préférentielle vers la MA, le NIA-AA (National Institute on Aging and Alzheimer's Association) recommande de vérifier par la technique de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomographie par émission de positrons (PET), la présence de biomarqueurs cérébraux caractéristiques de la MA (Vega & Newhouse, 2014; Jack *et al.*, 2018; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018). Ces biomarqueurs comprennent une atrophie des lobes temporaux médians, particulièrement de l'hippocampe et une diminution du métabolisme du glucose dans les zones temporo-pariétales du cerveau. La présence de peptides amyloïdes- β (espèce $A\beta_{42}$) et de la protéine tau totale et phosphorylée fibrillaire peut aussi être observée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Karran *et al.*, 2011; Vega

& Newhouse, 2014; Jack *et al.*, 2018) (Fig. 9). La présence d'un ou plusieurs de ces biomarqueurs est associée au risque de développer la MA. En effet, ces biomarqueurs de la MA sont présents avant l'apparition des symptômes cognitifs de la maladie (Bateman *et al.*, 2012). Selon le NIA-AA, il existe trois sous-types de MCI caractérisés par leur probabilité élevée, moyenne ou faible d'être dû à la MA (Campbell *et al.*, 2013; Vega & Newhouse,

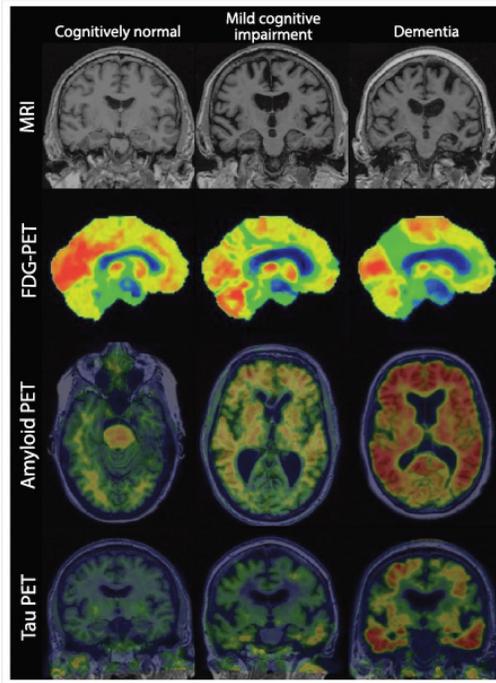


Figure 9 – Biomarqueurs de la MA selon l'état de la fonction cognitive des sujets.

2014).

Ces biomarqueurs ont été obtenus par imagerie à résonance magnétique (IRM) et par tomographie par émission de positrons (PET) dans les cerveaux de personnes ayant une cognition normale (à gauche), atteinte de déclin cognitif modéré (milieu) et atteinte de démence (à droite) (Petersen *et al.* 2016).

Cependant, lorsque la survenue d'un déclin cognitif précoce est suspectée chez un sujet, le recours aux techniques d'imagerie pour en évaluer la sévérité n'est pas systématique. L'assimilation à la catégorie MCI s'appuie alors sur des tests cliniques sous forme de questionnaire qui permettent d'examiner les capacités cognitives des sujets dans différents domaines (mémoire, attention, etc.) (Karran *et al.*, 2011; Petersen, 2016). Il en existe une dizaine, de complexité variable (Breton *et al.*, 2019). Le plus couramment utilisé est le MMSE (Mini Mental Status Examination), un questionnaire qui a été mis au point en 1975 (Ciesielska *et al.*, 2016) et dont la précision a depuis été remise en question (Ciesielska *et al.*, 2016; Jongsiriyanyong & Limpawattana, 2018; Breton *et al.*, 2019). Ainsi, d'autres tests ont vu le jour, comme par exemple le MoCA (Montreal Cognitive Assessment) qui est similaire

au MMSE, mais dont la sensibilité a été améliorée (Ciesielska *et al.*, 2016; Breton *et al.*, 2019).

b) Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

La MA est la cause de démence la plus répandue dans le monde ; parmi 47 millions de personnes atteintes de démence, 24 millions sont des cas d'Alzheimer (Ballard *et al.*, 2011; Winblad *et al.*, 2016; Jack *et al.*, 2018; Knopman *et al.*, 2018). Au vu de l'espérance de vie qui s'allonge continuellement (GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators, 2016), la MA pourrait affecter 100 millions de personnes d'ici 2050 (Skaper, 2012). Cette maladie neurodégénérative se manifeste par des atteintes prédominantes de la mémoire, des troubles de l'humeur, une altération des fonctions exécutives ainsi qu'une désorientation importante (Skaper, 2012; Tromp *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2019). L'ensemble de ces perturbations, qui apparaissent progressivement, conduit inexorablement à la perte d'autonomie des patients. Le coût lié au diagnostic et à la prise en charge des patients est considérable (Winblad *et al.*, 2016).

Le diagnostic irréfutable et définitif de la MA ne peut se faire que *post-mortem*, avec l'observation dans le cerveau des lésions histologiques caractéristiques: les plaques amyloïdes (pathologie amyloïde) et les enchevêtrements neurofibrillaires (pathologie tau) (Tremblay *et al.*, 2007; Ballard *et al.*, 2011; Karran *et al.*, 2011; Tremblay *et al.*, 2017).

Toutefois, un diagnostic clinique « probable » peut être posé du vivant du malade. Les tests du MMSE et du MoCA, souvent utilisés, révèlent la présence d'une démence, avec des scores obtenus faibles. Ils peuvent alors être complétés par des tests qui évaluent de façon beaucoup plus approfondie la sévérité de la démence d'un sujet. Le plus célèbre d'entre eux est l'ADAS-Cog (Alzheimer's Disease Assessment Scale – Cognition) (Karran *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2014), plus le score est élevé, plus la démence est sévère.

Ce diagnostic clinique peut être conforté par l'observation par imagerie IRM ou PET des biomarqueurs proposés par le NIA-AA (Jack *et al.*, 2018; Knopman *et al.*, 2018) dans le cerveau des sujets soupçonnés d'être atteints de la MA. En particulier, il a été mis en évidence que des niveaux faibles d'A β ₄₂ dans le LCR sont le signe d'une accumulation plus importante de ces peptides dans le parenchyme cérébral (Fagan *et al.*, 2006; DeMarshall *et al.*, 2016).

Pour permettre un diagnostic de la MA qui soit précoce, fiable, non invasif et moins onéreux que les options actuelles, le corps de la recherche sur la MA tente de trouver des biomarqueurs complémentaires. L'identification de biomarqueurs plasmatiques serait une

bonne stratégie (Hempel *et al.*, 2018; Zetterberg & Schott, 2019). DeMarshall *et al.*, ont obtenu des résultats prometteurs. En effet, ils ont pu discriminer avec une haute sensibilité, les auto-anticorps présents dans le sérum de sujets contrôles, MCI et Alzheimer, suggérant qu'il existe une signature dans les auto-anticorps produits selon l'état d'avancement du déclin cognitif (DeMarshall *et al.*, 2016). Les auto-anticorps sont naturellement produits par l'organisme et ciblent les antigènes du soi qui nuisent à l'homéostasie de l'organisme (par exemple, les marqueurs cellulaires de sénescence) (Nagele *et al.*, 2013).

La mesure des peptides A β dans le plasma en guise de biomarqueur est également prometteuse (Schindler *et al.*, 2019), mais la corrélation avec les peptides cérébraux est soumise à controverse (Reitz *et al.*, 2011).

c) La neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer

L'étiologie de la MA est mal connue, mais elle est caractérisée par une perte neuronale et synaptique importante ainsi que la présence cérébrale des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires (Skaper, 2012; Carrillo-Mora *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019).

Les plaques amyloïdes se forment consécutivement à l'agrégation extracellulaire du peptide amyloïde beta (A β) issu du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, Amyloid Precursor Protein). L'APP, enchâssée dans la membrane plasmique des neurones, peut entrer dans deux voies de transformation distinctes, la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique. Dans la voie non-amyloïdogénique, l'APP est clivée par la α -secrétase (ou ADAM10) donnant naissance au fragment appelé sAPP α (Querfurth & LaFerla, 2010). Les fonctions connues de ce fragment incluent des effets neuroprotecteurs, neurotrophiques et de maintien des processus sous-tendant la mémoire (Müller *et al.*, 2017; Lopez Sanchez *et al.*, 2019). Dans la voie amyloïdogénique, l'APP subit deux clivages consécutifs par la β -secrétase (ou BACE1) puis la γ -secrétase, conduisant à la libération dans le milieu extracellulaire du peptide A β , qui présente un fort pouvoir d'agrégation. Ces deux types de transformation de l'APP se produisent naturellement dans le cerveau et se trouvent dans un équilibre qui favorise la voie non-amyloïdogénique, en conditions physiologiques (Agostinho *et al.*, 2015; Coronel *et al.*, 2019). Cet équilibre est maintenu notamment grâce à un système de clairance et de dégradation des peptides A β , dont les principaux acteurs sont la néprilysine, l'IDE (Insulin Degrading Enzyme) ou l'apolipoprotéine E (ApoE) (Saido & Leissring, 2012; Tarasoff-Conway *et al.*, 2015) (Fig. 10).

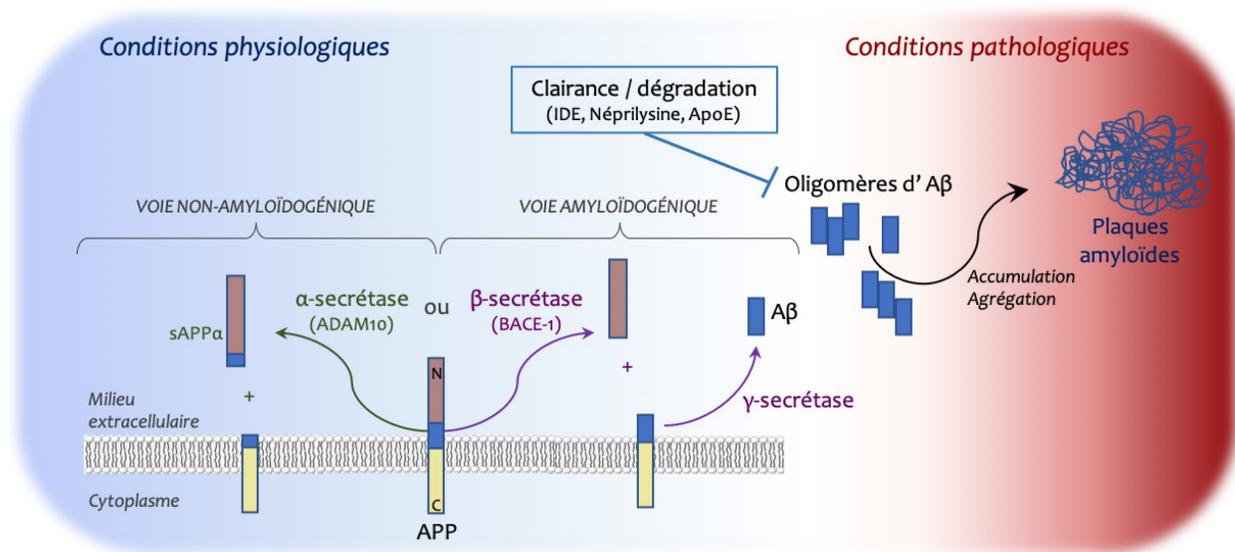


Figure 10 – Les voies de transformation de l’APP.

L’APP entre préférentiellement dans la voie non-amyloïdogénique en conditions physiologiques, mais au cours du vieillissement, la voie amyloïdogénique prend le dessus et conduit à une accumulation excessive de peptides Aβ qui s’agrègent jusqu’à former les plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d’Alzheimer.

Il existe plus de 18 espèces de peptides Aβ différant par leur taille, qui est déterminée selon le site de clivage de la γ-sécrétase (Kaminsky et al., 2010). Toutefois, deux peptides sont très largement majoritaires ; l’Aβ₄₀ et l’Aβ₄₂ (Plant et al., 2003; Tarasoff-Conway et al., 2015), composés de 40 et 42 acides aminés respectivement. Il est à noter que c’est bien l’accumulation excessive de ces peptides qui est en cause dans la MA. Leur production est normale, ils possèdent des propriétés antioxydantes et exercent des effets bénéfiques sur la plasticité synaptique, la viabilité des neurones ou encore leur excitabilité (Zou *et al.*, 2002; Plant *et al.*, 2003; Esteban, 2004; Plant *et al.*, 2006; Abramov *et al.*, 2009). Cependant, la toxicité de ces peptides intervient dès lors que leur concentration devient trop élevée (Zou *et al.*, 2002; Puzzo *et al.*, 2008) mais dépend aussi de leur état d’agrégation, les formes monomériques étant les moins toxiques (Zou *et al.*, 2002; Lesne, 2014; Coronel *et al.*, 2019). Ces peptides, en s’agrégeant, forment des oligomères, puis des fibrilles, jusqu’à devenir les plaques amyloïdes (Hou et al., 2019). Dans la pathologie de type Alzheimer, non seulement la production de ces peptides est excessive, mais leur élimination semble également défectueuse (Mawuenyega et al., 2010; Tarasoff-Conway et al., 2015).

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont la conséquence de la phosphorylation excessive et anormale de la protéine tau.

En conditions physiologiques, la fonction majeure de la protéine tau est de stabiliser les microtubules, surtout dans les axones des neurones (Skaper, 2012). Cette fonction est régulée par des modifications post-traductionnelles dont la principale est la phosphorylation (Martin et al., 2011; Medina et al., 2016). Plus de 80 sites de phosphorylation de la protéine tau ont été identifiés, et il est bien admis que la phosphorylation induit la perte d'affinité de tau pour les microtubules dont la stabilité n'est plus assurée (Martin et al., 2011; Skaper, 2012). Ainsi, ces processus dynamiques de phosphorylation / déphosphorylation de tau, qui déstabilisent / stabilisent les microtubules des neurones, permettent une bonne fonction synaptique, notamment en facilitant la libération de produits synaptiques (Medina et al., 2016; Regan et al., 2017).

En conditions pathologiques, dont les causes n'ont pas été élucidées, la protéine tau subit une augmentation importante du nombre de phosphorylations d'une part, sur des sites anormaux d'autre part. L'hyperphosphorylation de tau impliquée dans la MA fait référence à la fois au fait que la protéine contient plus de sites phosphorylés, et à l'augmentation de la quantité de protéines tau phosphorylées (Martin et al., 2011). En plus de la perte de stabilité des microtubules, la protéine tau ainsi hyperphosphorylée, s'agrège à son tour et forme des fibrilles hélicoïdales dont l'accumulation forme les enchevêtrements neurofibrillaires dans le compartiment intracellulaire (Ballard et al., 2011) (Fig. 11). L'hypothèse qui prédomine pour expliquer cette perte de contrôle de la phosphorylation de tau propose l'apparition d'un déséquilibre entre les kinases et les phosphatases de tau (Martin et al., 2011; Skaper, 2012). Notamment, l'expression et l'activité des principales kinases de tau, comme par exemple GSK3 β , CDK5, DYRK1A ou encore p38, ont été rapportées comme étant perturbées dans des cerveaux de patients Alzheimer (Martin et al., 2011). La protéine tau est impliquée dans d'autres pathologies, mais son accumulation sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires dans les neurones est une caractéristique de la MA (Skaper, 2012).

Dans le cerveau, le cortex et l'hippocampe sont des structures particulièrement affectées par la neuropathologie type Alzheimer (Tremblay *et al.*, 2007; Fjell *et al.*, 2014; Kwiatek-Majkusiak *et al.*, 2015). L'accumulation progressive des oligomères d'A β et des agrégats de protéine tau phosphorylée induisent une perte neuronale et synaptique significative qui altère les transmissions cholinergique, sérotoninergique, noradrénergique et

dopaminergique (Reitz *et al.*, 2011; Carrillo-Mora *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019) et participe activement à l'atrophie cérébrale, en particulier de l'hippocampe (Dhikav & Anand, 2011).

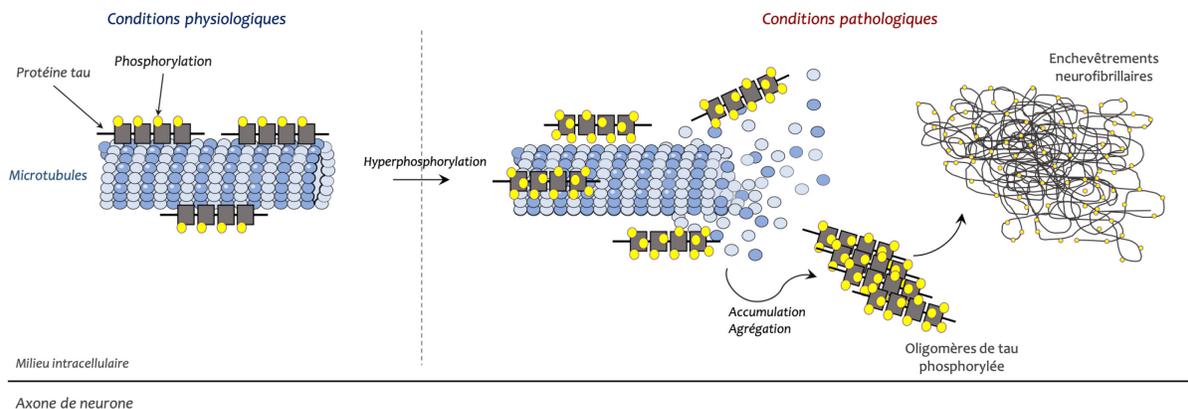


Figure 11 – Les enchevêtrements neurofibrillaires.

Leur formation est due à une hyperphosphorylation de la protéine tau sur des sites anormaux. La protéine tau perd alors son affinité pour les microtubules qui se désorganisent. La protéine tau hyperphosphorylée forme des agrégats qui conduisent à la formation des enchevêtrements neurofibrillaires.

d) Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer et traitements disponibles

Les facteurs de risque de développer la MA ont été classifiés selon leur caractère modifiable ou non.

Les facteurs non-modifiables comprennent l'âge, le sexe ainsi que des déterminants génétiques. La MA est une maladie de la vieillesse et ne se déclare pas avant la soixantaine d'années (Carrillo-Mora *et al.*, 2014; Agostinho *et al.*, 2015; Winblad *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2019). Le risque de développer la MA est augmenté par le sexe, en effet, la prévalence de la MA est plus élevée chez les femmes (GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019; Hou *et al.*, 2019) (Fig. 12).

En outre, des mutations autosomiques dominantes dans les gènes codant pour l'APP et les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), qui sont les sous-unités catalytiques de la γ -secrétase (Carrillo-Mora *et al.*, 2014), sont responsables de la forme familiale héréditaire de la MA qui se manifeste vers l'âge de 60 ans (Silva *et al.*, 2019). Le fait d'être porteur de ces mutations est associé à une probabilité supérieure à 85% d'être atteint de la MA (Reitz *et al.*, 2011). Cependant, la forme familiale est responsable de moins de 5% des cas d'Alzheimer, les 95% restants étant dus à la forme sporadique qui se déclare plutôt après 65 ans (Agostinho *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019). Le facteur de risque génétique le plus fortement mis en cause dans la forme sporadique de la MA est le gène codant pour l'apoE, en particulier l'allèle $\epsilon 4$.

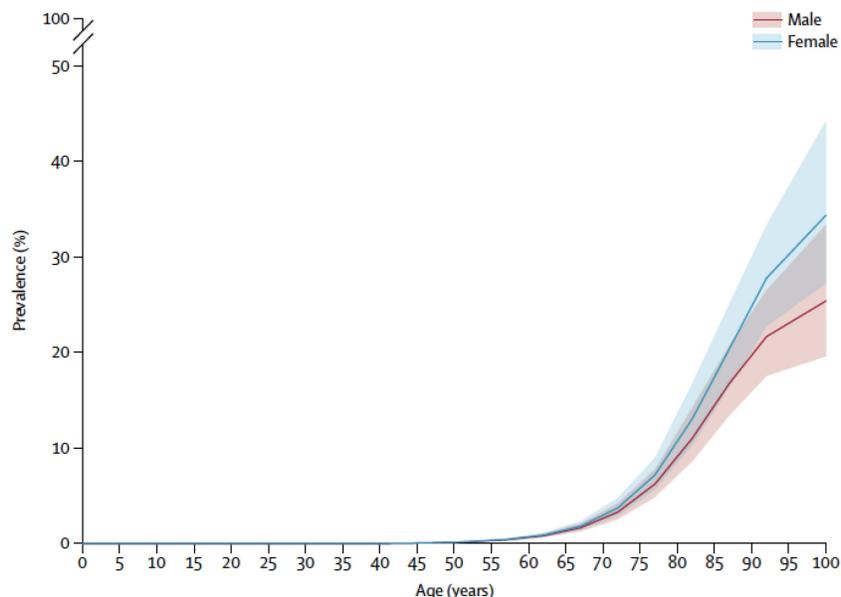


Figure 12 – Prévalence mondiale de la maladie d’Alzheimer selon l’âge et le sexe.

La prévalence est exprimée en pourcentage de la population atteint par la maladie en 2016, entouré de son intervalle de confiance à 95%. La courbe des femmes est bleue, la courbe des hommes est rouge (GBD 2016 Dementia Collaborators, 2019).

L’homozygotie pour cet allèle augmente d’un facteur 12 le risque de développer la MA (Silva et al., 2019). De même, la susceptibilité de déclarer la MA est accrue avec le cumul de l’hétérozygotie $\epsilon 4/\epsilon 2$ et du sexe féminin (Farrer et al., 1997). Beaucoup d’autres mutations génétiques ont été mises en lien avec la susceptibilité de développer la MA, y compris le récepteur des œstrogènes (Scheltens *et al.*, 2016; A Armstrong, 2019).

Il existe également un très grand nombre de facteurs de risque modifiables. Les maladies cardiovasculaires, le stress, le niveau d’éducation, la sédentarité, le tabagisme, le diabète de type 2 ou encore une mauvaise alimentation sont favorables au développement de la MA (Winblad *et al.*, 2016; A Armstrong, 2019; Silva *et al.*, 2019). La malnutrition en particulier, n’est pas peu commune parmi les personnes âgées. Elles sont souvent victimes d’anorexie et/ou de dysphagies pouvant induire un état de dénutrition (Visvanathan & Chapman, 2009; Sura *et al.*, 2012; Willis, 2017) qui contribuerait au développement des enchevêtrements neurofibrillaires (A Armstrong, 2019).

Les options thérapeutiques actuellement disponibles sur le marché sont d’une efficacité limitée et purement symptomatique (Tariot & Federoff, 2003; Tayeb *et al.*, 2012). Seules quatre molécules possèdent une autorisation de mise sur le marché : le donépépil, la

galantamine, la rivastigmine et la mémantine (Graham et al., 2017). Le donézépil, la galantamine et la rivastigmine sont des inhibiteurs de cholinestérase qui sont prescrits dans les phases les moins avancées de la maladie (MA modérée). En effet, leur administration a pour but de freiner la chute d'acétylcholine qui survient à mesure que la maladie progresse (Tayeb et al., 2012). La mémantine est un antagoniste non compétitif du récepteur NMDA qui permet de neutraliser les effets excitotoxiques consécutifs à la libération excessive de glutamate (Tariot & Federoff, 2003; Tayeb et al., 2012). Aucun de ces traitements n'est capable d'empêcher ni de ralentir les dommages neuronaux observés dans la MA, responsables des symptômes cognitifs (Alzheimer's Association, 2016). Cependant, les compagnies pharmaceutiques cherchent en permanence à mettre au point de nouvelles molécules thérapeutiques qui arrivent jusqu'en phase clinique II ou III, mais ne parviennent pas à aller au-delà. Parmi ces molécules se trouvent des inhibiteurs de β - et γ -secrétase, mais sont également à l'essai des immunothérapies dont l'objectif est d'injecter des anticorps dirigés contre les peptides amyloïdes (le Solanezumab par exemple), dans le but d'améliorer la clairance des peptides A β et des oligomères de Tau (Tayeb et al., 2012; Graham et al., 2017; Viña & Sanz-Ros, 2018).

Compte tenu des facteurs de risque et de l'inefficacité des traitements actuels, il n'est pas surprenant que le nombre de patients atteints de la MA ne cesse de croître.

e) Modèles animaux de la MA

La reproduction de la pathologie Alzheimer chez l'animal est depuis longtemps un défi technique pour la recherche sur la MA et représente un outil indispensable. Ainsi, plusieurs modèles de la MA ont vu le jour au cours des dernières décennies.

MODÈLES TRANSGÉNIQUES

La manipulation de gènes impliqués dans la genèse des marqueurs de la MA est l'une des stratégies les plus largement utilisées pour modéliser la MA chez l'animal. De nombreux animaux ont permis de mettre en œuvre des modèles de la MA, tels que le rat ou certains invertébrés comme la drosophile (*Drosophila melanogaster*) ou le ver *Caenorhabditis elegans*, mais la majorité des modèles a été mise au point chez la souris (Hsiao et al., 1996; Elder et al., 2010; Hou et al., 2019). Les souris transgéniques sont de loin les plus utilisées, elles expriment des mutations humaines de la protéine APP seule (souris APP23, souris Tg2576 ou souris PDAPP), ou combinées aux présénilines humaines mutées (souris

APP/PS1, souris 5xFAD) (pour revue : (Elder *et al.*, 2010; Bilkei-Gorzo, 2014; Webster *et al.*, 2014)). Toutes ces souris sont de ce fait des modèles de la forme familiale de la MA. Il n'existe pas, à ce jour, de modèle de la forme sporadique (Foidl & Humpel, 2020).

Des souris exprimant des formes mutées de la protéine tau ont également été créées. Cependant, à ce jour, aucune mutation de tau n'a été identifiée dans Alzheimer (Martin *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2016), contrairement à d'autres pathologies neurodégénératives qui impliquent l'agrégation de tau telles que la démence fronto-temporale ou la maladie de Pick (Götz *et al.*, 2007). Ainsi, le fait de considérer comme modèles d'Alzheimer des souris transgéniques exprimant une protéine tau mutée peut être remis en cause.

La souris 3xTg-AD

Le premier modèle à avoir permis la concomitance des pathologies amyloïde et tau, est la souris triple-transgénique 3xTg-AD mise au point par Oddo *et al.* en 2003. Ce modèle a été obtenu par l'insertion de deux transgènes humains ; l'APP humaine portant la mutation *Swedish*, et la protéine tau humaine mutée (P301L) dans des embryons de souris homozygotes knock-in de la préséniline 1 mutée (PS1_{M146V}). L'APP_{swe} et Tau_{P301L} sont sous le contrôle du promoteur murin Thy 1.2 qui permet une expression neuronale de ces transgènes, tandis que la forme mutée de PS1 est sous le contrôle du promoteur murin de la PS1 (Oddo, Caccamo, Shepherd, *et al.*, 2003). Le développement des lésions caractéristiques de la MA se produit ainsi progressivement au cours du vieillissement de la souris (Oddo, Caccamo, Kitazawa, *et al.*, 2003; Oddo, Caccamo, Shepherd, *et al.*, 2003). Ainsi, chez ce modèle, la neuropathologie Alzheimer suit une dynamique spatio-temporelle cérébrale très similaire à celle observée chez les patients (Tremblay *et al.*, 2007; St-Amour *et al.*, 2014; Vandal *et al.*, 2014; Graham *et al.*, 2017). De plus, cette souris développe des altérations de la mémoire de reconnaissance, de la mémoire de travail et de la mémoire spatiale (Filali *et al.*, 2012; Arsenault *et al.*, 2013; St-Amour *et al.*, 2014; Webster *et al.*, 2014). Pour toutes ces raisons, le modèle de souris 3xTg-AD est un modèle de choix dans l'étude de la pathogenèse de la MA.

MODÈLES D'INJECTION INTRACRÂNIENNE DE PEPTIDES AMYLOÏDES

Une stratégie alternative à la transgénèse a émergé après que le lien entre déclin cognitif et formes solubles de peptides A β a été mis en lumière : l'injection intracérébrale de peptides amyloïdes (Chambon *et al.*, 2011). Contrairement aux modèles transgéniques, l'évaluation des atteintes cellulaires, fonctionnelles et comportementales est précoce et peut se faire dans des délais beaucoup plus courts. De plus, les coûts sont moins élevés que

l'établissement d'une lignée d'animaux transgéniques (Chambon et al., 2011; Götz et al., 2018). Les injections stéréotaxiques se font généralement dans les ventricules cérébraux ou bien dans l'hippocampe, mais peuvent être réalisées dans d'autres structures cérébrales. Les peptides les plus couramment injectés sont les $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ et $A\beta_{25-35}$ (Chambon et al., 2011). Le peptide $A\beta_{25-35}$ est un fragment de 11 acides aminés commun aux peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$, qui conserve leur toxicité, et correspondrait de ce fait à la zone active des peptides $A\beta$ (Kaminsky et al., 2010; Millucci et al., 2010). Le fragment 25-35 aurait été retrouvé dans des cerveaux de patients Alzheimer (Kubo et al., 2002; Millucci et al., 2010).

Injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v) de peptides $A\beta_{25-35}$

La particularité de ce peptide tient à sa capacité à s'agréger très rapidement *in vitro* et à induire des effets neurotoxiques en réduisant la viabilité des neurones (Pike et al., 1993; 1995). *In vivo*, l'injection aigue de l' $A\beta_{25-35}$ dans les ventricules cérébraux permet sa diffusion dans tout le cerveau, et notamment dans l'hippocampe, où il est encore détecté trois semaines après avoir été injecté chez le rat. L'injection de ce peptide induit un comportement de type anxieux, associé à une augmentation de la libération de l'hormone de stress, la corticostérone. Elle conduit également à une neuroinflammation importante, une augmentation de la phosphorylation de tau, de l'expression de l'APP et de son clivage amyloïdogénique par la β -sécrétase, associées à des perturbations de mémoires hippocampe-dépendantes (Zussy et al., 2011; 2013). Chez la souris jeune adulte, l'injection ventriculaire de peptides $A\beta_{25-35}$ stimule fortement la production de peptides amyloïdes endogènes et de l'APP (Chavant et al., 2010; Meunier et al., 2013). Elle perturbe également la plasticité synaptique et la neurogenèse hippocampique (Maurice, Lockhart, Su, *et al.*, 1996; Isono *et al.*, 2013; Wang, Chen, Li, *et al.*, 2015) et est associée à des altérations de la mémoire de travail, de la mémoire de reconnaissance et de la mémoire spatiale (Maurice, Lockhart, & Privat, 1996; Maurice, Lockhart, Su, *et al.*, 1996; Chavant *et al.*, 2010; Isono *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013; Wang, Chen, Li, *et al.*, 2015).

Ainsi, le modèle d'injection I.C.V de peptides $A\beta_{25-35}$ permet de reproduire les atteintes précoces de la pathologie Alzheimer, grâce à une injection intracrânienne unique, ce qui rend ce modèle disponible très rapidement. De plus, ces atteintes sont obtenues chez des animaux adultes, pas nécessairement âgés, et permet donc une évaluation des conséquences directement liées au peptide injecté, et donc de s'affranchir des dérèglements liés à l'âge.

II. La vitamine A dans la prévention de la maladie d'Alzheimer

a) La signalisation de l'AR dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer

Le vieillissement affaiblit l'activité de la voie de signalisation de l'AR, ce qui ébranle les mécanismes qui sous-tendent les processus de mémoire et contribue au déclin cognitif lié à l'âge (Partie B. III.). Or, le premier facteur de risque de développer la MA est l'âge avancé (Winblad et al., 2016).

Une étude menée par Goodman et Pardee en 2003 a mis en évidence que des marqueurs génétiques associés à la forme sporadique de la MA sont situés à des loci chromosomiques génétiquement liés à des gènes codant pour des récepteurs de l'AR, de protéines de transport ou de métabolisation des rétinoïdes (Goodman & Pardee, 2003). En d'autres termes, des polymorphismes de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A sont physiquement très proches de marqueurs génétiques de la MA.

Or, une diminution de la concentration sérique de vitamine A a été rapportée chez des patients Alzheimer (Bourdel-Marchasson *et al.*, 2001; Rinaldi *et al.*, 2003; Lopes da Silva *et al.*, 2014). De même, des mesures effectuées *post-mortem* dans des cerveaux de patients révèlent une diminution de l'expression des récepteurs RARs et de l'enzyme de synthèse de l'AR (RALDH) dans le cortex et dans les vaisseaux des méninges (Corcoran et al., 2004), ainsi qu'une baisse de l'expression de la protéine de transport du rétinol (RBP) dans le LCR (Jung et al., 2008). Ces observations concordent donc avec l'hypothèse d'un affaiblissement de l'activité de la voie de signalisation de l'AR chez les malades d'Alzheimer.

De façon intéressante, la carence en vitamine A chez le rongeur induit des altérations comparables à ce qui est observé dans la pathologie caractéristique de la MA. Corcoran *et al.* 2004 montrent qu'un an de carence en vitamine A conduit à l'accumulation de dépôts amyloïdes dans le cerveau antérieur chez le rat, alors que six mois suffisent à diminuer l'expression de RAR α et de la RALDH (Corcoran et al., 2004). Dans une autre étude, la carence en vitamine A chez le rat induit des modifications anatomiques comparables à ce qui est observé dans les maladies neurodégénératives, telles qu'une atrophie du volume cérébral associée à une augmentation du volume des ventricules (Ghenimi et al., 2009).

Afin d'évaluer les conséquences d'une subcarence en vitamine A périnatale chez l'adulte, Zeng *et al.* 2017 ont étudié la neuropathologie de souris APP/PS1 adultes ayant été soumises à une subcarence *in utero* et/ou post-natale. Leurs travaux montrent que l'exposition à la subcarence de la vie périnatale jusqu'à l'âge adulte (régime alimentaire à 0,4 UI/g de vitamine A) accentue la pathologie amyloïde : les animaux subcarenés

présentaient une augmentation de la production de peptides amyloïdes et de l'expression de BACE1 et APP ainsi qu'une diminution de l'expression d'ADAM10 par rapport aux contrôles. La subcarence a également significativement détérioré leurs performances de mémoire à l'âge adulte (Zeng, Chen, *et al.*, 2017). De plus, le fait d'exposer uniquement la mère à la subcarence suffit à induire cette aggravation, même si la progéniture n'y est pas elle-même exposée. Enfin, l'administration aigüe d'une dose de vitamine A par gavage restaure tous les paramètres au niveau des souris sous régime contrôle, et ce d'autant plus efficacement que cet apport est proche de la naissance (Zeng, Chen, *et al.*, 2017). De façon similaire, l'exposition à un régime subcarencé (0,4 UI/g) de la vie périnatale jusqu'à la vie adulte aggrave les effets délétères de l'injection intra-hippocampique de peptides A β ₄₂ sur les capacités d'apprentissage et de mémoire de rats adultes dans le paradigme de la piscine de Morris. De plus, dans l'hippocampe de ces rats, l'expression des récepteurs de l'AR était très fortement corrélée à l'expression d'ADAM10 et IDE (Zeng, Li, *et al.*, 2017). À l'inverse, les travaux de Goncalves *et al.* 2013 montrent que la présence de peptides amyloïdes dans le milieu de culture de microglies interrompt complètement la production d'AR par ces cellules (Goncalves *et al.*, 2013), ce qui laisse supposer un cercle vicieux entre la présence de peptides amyloïdes et la synthèse d'AR.

Parallèlement, les niveaux de rétinol sanguin chez des sujets âgés ont été corrélés à l'état de leur fonction cognitive. L'étude de Huang *et al.* 2018 révèle que les sujets MCI ont des niveaux circulants de rétinol significativement inférieurs à ceux de sujets ayant une cognition normale. De plus, cette concentration sanguine de vitamine A corrèle significativement ($p < 0.01$) avec toutes les fonctions cognitives mesurées chez les 1754 sujets : fonctions visuelles et exécutives, la capacité à nommer, l'attention, le langage, la capacité d'abstraction, la mémoire et le rappel différé et enfin le score obtenu au MoCA (Huang *et al.*, 2018).

Dans l'étude de Zeng *et al.* 2017, le rétinol circulant est d'autant plus diminué que les sujets âgés sont atteints de déclin cognitif léger à modéré par rapport à ceux dont la fonction cognitive est normale. Ici encore, cette concentration corrèle avec tous les tests cognitifs ayant été réalisés, évaluant la fonction cognitive, la sévérité d'une démence potentielle et le bon maintien de l'autonomie dans les activités de la vie quotidienne (ADAS-Cog, ADL, MMSE, IADL) (Zeng, Chen, *et al.*, 2017).

Ainsi l'ensemble de ces données suggère fortement que l'altération de la signalisation de l'AR pourrait contribuer au développement de la pathologie de type Alzheimer.

b) Les rétinoïdes : piste thérapeutique de la maladie d'Alzheimer

Avec l'émergence des arguments en faveur d'une altération de la voie des rétinoïdes dans le développement de la MA, et face à l'urgence de développer des stratégies thérapeutiques, de nombreuses études ont testé les effets de rétinoïdes naturels ou de synthèse sur la neuropathologie Alzheimer de différents modèles (pour revue : (Lee *et al.*, 2009; Sodhi & Singh, 2014; Chakrabarti *et al.*, 2016)). L'utilisation de ces molécules, *in vitro* et *in vivo*, a montré de nombreux effets bénéfiques (Tableau 7) de stimulation de la voie non-amyloïdogénique et d'inhibition de la voie amyloïdogénique de transformation de l'APP (Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Holthoewer *et al.*, 2012; Wang, Chen, Liu, *et al.*, 2015). Elle a également permis de diminuer l'accumulation des peptides amyloïdes et des plaques associées (Ding *et al.*, 2008; Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Cramer *et al.*, 2012; Lerner *et al.*, 2012; Behairi *et al.*, 2016; Casali *et al.*, 2018) ainsi que la neuroinflammation qui leur est due (Ding *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2013; Behairi *et al.*, 2016; Takamura *et al.*, 2017; Casali *et al.*, 2018). L'emploi des rétinoïdes améliore la clairance des peptides (Cramer *et al.*, 2012; Bachmeier *et al.*, 2013; Goncalves *et al.*, 2013) et réduit la phosphorylation de la protéine tau (Ding *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2013). Enfin, plusieurs études rapportent une amélioration des capacités de mémoire dans différents paradigmes consécutivement au traitement rétinoïde reçu (Ding *et al.*, 2008; Cramer *et al.*, 2012; Lerner *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2013; Behairi *et al.*, 2016; Casali *et al.*, 2018) (Tableau 7). Or, toutes ces études ont utilisé des dérivés de l'AR, et non pas de la vitamine A.

Trois études cliniques impliquant l'utilisation de rétinoïdes ont été menées chez des sujets atteints d'Alzheimer. Endres *et al.* 2014 ont administré 30 mg d'acitrétine (ligand des RARs) par jour sous forme de capsules à 11 patients Alzheimer (ou bien un placebo, n=11) pendant quatre semaines dans une étude en double-aveugle. Ce traitement n'a pas eu d'effet sur la quantité de peptides A β ₄₂, de protéine tau totale, ni de la protéine tau phosphorylée retrouvée dans le LCR des patients. De même, l'acitrétine n'a pas été capable d'améliorer le score obtenu au MMSE à l'issue du traitement. Ceci peut être dû à la courte durée du traitement et au petit nombre de patients inclus. Toutefois, l'administration d'acitrétine a permis d'augmenter la quantité de fragments sAPP α dans le LCR, traduisant le clivage non-amyloïdogénique de l'APP (Endres *et al.*, 2014). Dans une autre étude en double-aveugle avec placebo (n=20 sujets), Cummings *et al.* 2016 ont observé qu'une dose croissante de Bexarotène (agoniste des RXRs) pendant quatre semaines améliorait la clairance cérébrale

des peptides $A\beta_{42}$ (diminution dans le cortex, augmentation dans le plasma) uniquement chez les patients non-porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apoE. De même, seuls les non-porteurs de cet allèle ont amélioré leur score obtenu au MMSE suite au traitement. Enfin, une étude débutée au Japon en 2010 teste les effets de 4 mg de tamibarotène (agoniste des RARs) sur la neuropathologie Alzheimer et l'évolution de la fonction cognitive après 12 et 24 semaines de traitement chez 50 sujets. Cette étude n'a pas encore publié ses résultats (NCT01120002).

ÉTUDES AYANT UTILISÉ DES RÉTINOÏDES CHEZ DES MODÈLES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER (non exhaustif)

Modèle	Rétinoïde (agoniste)	Mode d'administration	Conséquences sur les acteurs de la neuropathologie	Conséquences comportementales	Référence
Souris Tg APP/PS1 (Mâles)	AR	iP (20 mg/kg), 3 x /sem. (8 sem.)	Cortex / Hippocampe : ↓ Volume et nombres de plaques amyloïdes ↓ Phosphorylation de tau ↓ Neuroinflammation (activation astrocytaire et microgliale)	↑ Mémoire spatiale	Ding et al. 2008
Cellules N2A (surexprimant APP _{swE}) Cellules SH-SY5Y	• AR (RARs) • TTNPB (RARs) • AR-9-cis (RXRs) • Acitrétine (RARs)	<i>In vitro</i>	↑ Ratio sAPPα/sAPPβ ↑ Expression d'ADAM10	-	Tippman et al. 2009
Souris APP/PS1 (Mâles)	Acitrétine (RARs)	Injection intra-hippocampique (100 mM) Euthanasie 48h après.	↑ Ratio sAPPα/sAPPβ ↓ Peptides Aβ ₄₀ dans le cortex ↓ Peptides Aβ ₄₂ dans le cortex	-	
Neurones corticaux (souris NIH Swiss)	• AR (RARs) • AM580 (RARα) • BMS194753 (RARα)	<i>In vitro</i>	↓ Accumulation d'Aβ intra- et extracellulaire ↑ Expression d'ADAM10 ↑ Survie neuronale Par les agonistes RARα	-	Jarvis et al. 2010
Souris Tg 2576 (Mâles)	• CD2019 (RARβ) • CD437 (RARγ)	iP (1 mg/kg) ou Gavage (3,6 mg/kg) (tous les 3 jours/4mois)	↑ Fragment sAPPα dans le cortex (iP) ↑ Expression ADAM10 dans le cortex (iP) ↓ Peptides Aβ ₄₀ dans le cortex (iP et gavage) ↓ Peptides Aβ ₄₂ dans le cortex (iP et gavage) Par les agonistes RARα	-	
Souris Tg APP/PS1 (sexe non précisé)	Bexarotène (RXRs)	Gavage (100 mg/kg/jour) (3, 7 ou 14 jours)	↓ Nombre et volume des plaques amyloïdes (cortex et hippocampe) ↓ Peptides Aβ ₄₀ et Aβ ₄₂ dans le liquide interstitiel cérébral	↑ Mémoire spatiale	Cramer et al. 2012
Souris 3xTg-AD (sexe non précisé)	AR	iP (20 mg/kg), tous les 2 jours/ 8 sem.	↓ Marquage Aβ positif	↑ Mémoire spatiale	Lerner et al. 2012
Culture primaire de microglie murine	• AM580 (RARα) • CD2019 (RARβ)	<i>In vitro</i>	↓ (Synthèse d'AR par ajout d'Aβ) ↓ Neuroinflammation (TNF-α) ↑ Expression ApoE ↑ Clairance des Aβ ↑ Activité de la néprilysine et d'IDE	-	Goncalves et al. 2013
Souris Tg 2576 (sexe non précisé)	• CD437 (RARγ)	iP (1 mg/kg) 3 x / sem. (3 mois)	↓ Nombre de plaques amyloïdes (cortex et hippocampe) ↓ Phosphorylation de tau	↑ Mémoire de travail ↓ Comportement anxieux	
Souris Tg APP _{swE} /Tau _{P301L} (sexe non précisé)				-	
Souris C57BL/6 (Mâles): Injection d' Aβ ₄₂ humains (caudé/putamen du striatum)	Bexarotène (RXRs)	Injection unique (iP, 20 mg/kg)	↑ Clairance (mesures des Aβ présents dans le plasma)	-	Bachmeier et al. 2013
Culture primaire de neurones de rat	AR	<i>In vitro</i>	↓ Expression BACE1	-	Wang et al. 2015
Souris Tg 2576 (sexe non précisé)		iP (20 mg/kg), tous les 2 jours/12 sem.	↓ Expression BACE1 (Hippocampe)	-	
Rats Wistar âgés (19 mois) (Mâles)	AR	iP (150 µg/ml/rat/jour) (30 jours)	↓ Dépôts amyloïdes (Aβ ₄₂) ↓ Mort neuronale (cortex et hippocampe) ↓ Neuroinflammation	↑ Mémoire spatiale	Behairi et al. 2016
Souris 3xTg-AD (Femelles)	AR	iP (20 mg/kg), 3 x / sem. (3 sem.)	↓ Neuroinflammation (activation astrocytaire et microgliale)	-	Takamura et al. 2017
Souris Tg APP/PS1 (Mâles et femelles)	Bexarotène (RXRs)	Gavage (100 mg/kg/jour) (14 jours)	↓ Microgliose ↓ Plaques amyloïdes	↑ Mémoire de reconnaissance	Casali et al. 2018

iP : intrapéritonéale; Tg : transgénique ; TNF-α : Tumor Necrosis Factor α (cytokine pro-inflammatoire)

Tableau 7 – Récapitulatif des études ayant utilisé des rétinoïdes chez des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer.

c) Intérêt d'une approche préventive nutritionnelle

Les recherches qui ont été menées sur la maladie d'Alzheimer, pour en déterminer les causes, se sont longtemps focalisées sur les pathologies amyloïde et tau. À ce jour, le dogme qui les tient pour responsables de la maladie a été remis en question et la possibilité que ces lésions soient plutôt des conséquences de la maladie est envisagée. Ceci laisse toujours sans réponse la question de l'origine de la maladie. Au cours des dernières décennies, les tentatives d'élaboration de nouvelles options thérapeutiques à l'égard de la MA se sont traduites par des échecs. De plus, les lésions caractéristiques de la MA commencent à se développer plusieurs années avant l'apparition des symptômes cognitifs et du diagnostic (Bateman et al., 2012). Enfin, le diagnostic définitif de la MA ne peut se faire que *post-mortem*, par la mise en évidence des lésions (Ballard et al., 2011; Karran et al., 2011).

La considération de tous ces éléments incite grandement à envisager la définition d'une stratégie de prévention de la MA (St-Amour *et al.*, 2016; Viña & Sanz-Ros, 2018) (Fig. 13). D'autant plus que les protocoles permettant d'identifier les sujets à risque de développer la MA (par exemple les sujets MCI) sont disponibles et maîtrisés. Le risque de développer la MA est hautement lié à de multiples aspects de l'environnement et de l'hygiène de vie d'un sujet. Ces aspects peuvent être modulés, encadrés et suivis au cours de sa vie.

Les arguments qui penchent en faveur du rôle de la nutrition dans la préservation de la fonction cognitive avec l'âge sont de plus en plus nombreux ces dernières années. Il y a un consensus sur le fait que le type de régime alimentaire impacte l'état cognitif et module le risque de développer une démence.

Un régime déséquilibré est un facteur de risque de développer la MA (Gustafson *et al.*, 2015; Morris, 2016; Scarmeas *et al.*, 2018; A Armstrong, 2019; Cremonini *et al.*, 2019). La surconsommation de régimes riches en sucres et en graisses altère les processus de mémoire et d'apprentissage et contribue au déclin cognitif (Hsu & Kanoski, 2014). Des mécanismes communs aux perturbations induites par la consommation de ces régimes et à celles présentes dans la MA ont été observés, et impliquent notamment une altération de l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (Hsu & Kanoski, 2014). De plus, un régime riche en gras aggrave la pathologie de type Alzheimer chez la souris 3xTg-AD (Vandal et al., 2014).

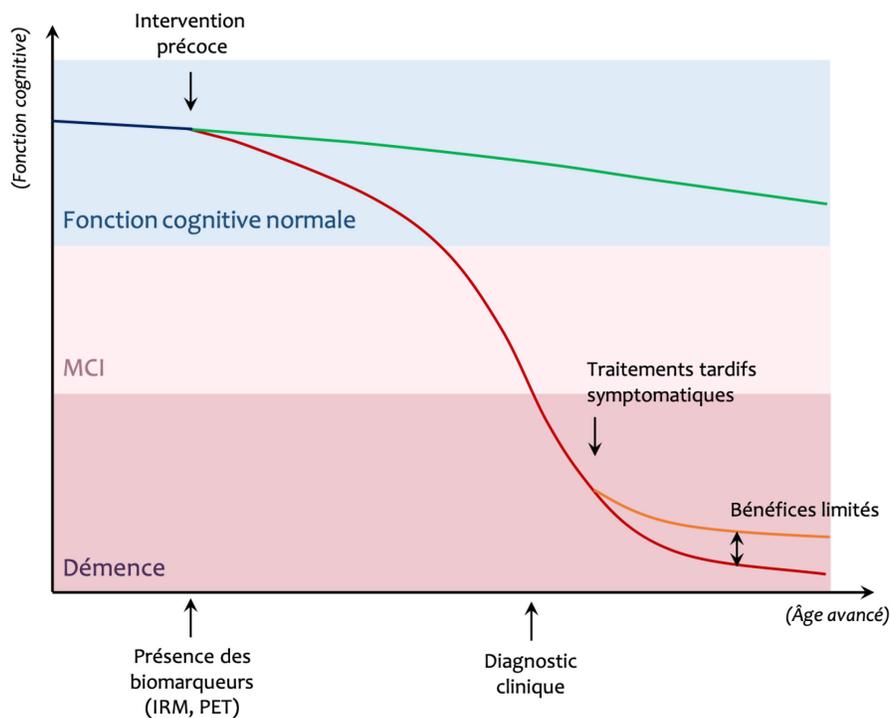


Figure 13 – Schéma représentatif du moment le plus approprié (hypothétiquement) pour prévenir la maladie d’Alzheimer.

La courbe rouge représente la progression caractéristique du déclin cognitif observé dans la MA et la courbe verte celle d’un déclin cognitif normal avec l’aide d’une intervention préventive adaptée. Le point de divergence de ces deux courbes serait le meilleur moment pour entreprendre une stratégie préventive. La courbe orange indique la faible efficacité des traitements actuels de la MA en raison du moment où ils interviennent, et de leurs effets seulement symptomatiques. (Adapté de St-Amour et al. 2016 et de Viña et al. 2018)

À l’inverse, certains types de régimes, comme le régime méditerranéen ou le régime DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), seraient associés à la préservation des capacités mentales et à un moindre risque de développer la MA notamment (Gustafson *et al.*, 2015; Milte & McNaughton, 2016; Morris, 2016; Dominguez & Barbagallo, 2018; Cremonini *et al.*, 2019). Chez le rongeur, beaucoup d’études ont également démontré les effets bénéfiques d’approches nutritionnelles sur des modèles de vieillissement ou de démence (pour revue : (Wahl et al., 2017)). L’étude FINGER (Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability), menée en Finlande chez 1260 sujets âgés entre 60 et 77 ans, a consisté à apporter pendant deux ans, un coaching régulier aux sujets concernant différents aspects de leur vie quotidienne, y compris l’alimentation. Une plus grande amélioration des performances cognitives a été observée chez les sujets ayant reçu le coaching comparativement à ceux qui ont eu un suivi classique (Ngandu et al., 2015).

Cette étude démontre que le conseil nutritionnel au cours du vieillissement physiologique devrait être envisagé pour empêcher le basculement vers le vieillissement pathologique.

En particulier, un régime enrichi en vitamine A pourrait être une option à envisager considérant ses effets bénéfiques sur les altérations moléculaires, fonctionnelles et comportementales liées au vieillissement, dont une grande partie a été présentée dans la partie B.

Même s'ils ne sont pas totalement compris à ce jour, les facteurs qui sont en cause dans l'affaiblissement de la signalisation de la vitamine A au cours du vieillissement, et qui peuvent potentiellement contribuer de ce fait au développement de la pathologie Alzheimer, font intervenir des désordres du métabolisme hépatique de cette vitamine (Dumetz *et al.*, 2019). Des déficits d'apport ou d'absorption de la vitamine A, induisant un statut vitaminique A inadéquat de certains sujets, peuvent également être en cause. Plus largement, tous les facteurs susceptibles de diminuer la biodisponibilité de la vitamine A ou de l'AR cérébral, affecteront la voie de signalisation de l'AR dans les tissus cibles, en particulier le cerveau. Ainsi, le niveau d'apport en d'autres nutriments pourra avoir des conséquences sur la biodisponibilité de l'AR et le niveau d'activité de sa voie de signalisation. Par exemple, la présence de lipides dans le régime alimentaire augmente l'efficacité d'absorption de la vitamine A (Iqbal & Hussain, 2009; Harrison *et al.*, 2012). La vitamine E également liposoluble, entre dans l'entérocyte par l'intermédiaire du récepteur SRBI (Iqbal & Hussain, 2009), de même que le β -carotène (Saeed *et al.*, 2017), précurseur du rétinol, ce qui peut les mettre en compétition pour l'absorption par l'entérocyte. À un autre niveau, la position des RXRs comme partenaire commun d'hétérodimérisation de nombreux autres récepteurs nucléaires, comme le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur de la vitamine D (VDR) ou encore le récepteur des acides biliaires (Idres *et al.*, 2002; Lane & Bailey, 2005; Berbis, 2010; Saeed *et al.*, 2017) place la voie de signalisation de la vitamine A en équilibre avec de multiples autres voies de signalisation qui répondent à des signaux hormonaux et nutritionnels. C'est ainsi que des déséquilibres alimentaires, mais aussi certains déséquilibres hormonaux vont également potentiellement perturber la voie de signalisation des rétinoïdes (Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997). L'ensemble de ces données suggère que la diminution de la biodisponibilité de l'AR ou de l'activité de sa voie de signalisation, au cours du vieillissement, peut avoir de nombreuses origines. Ces données peuvent également justifier, la nécessité de maintenir au cours du vieillissement le statut en vitamine A à un niveau optimal, afin de maintenir également l'ensemble des processus dans lesquels cette vitamine est impliquée, et notamment au niveau cérébral.

Les travaux de Mingaud *et al.* 2008 ont montré que la supplémentation en vitamine A par voie nutritionnelle s'est révélée plus efficace sur la récupération de la mémoire de travail que l'administration pharmacologique d'AR ou à la combinaison des deux (Mingaud *et al.*, 2008). Les travaux de Dumetz *et al.* 2019, ont démontré que l'utilisation d'un régime enrichi en vitamine A au cours du vieillissement corrige la diminution cérébrale d'AR et les atteintes morphologiques des neurones de l'hippocampe contribuant aux perturbations de mémoire des animaux tout en maintenant un métabolisme hépatique des rétinoïdes normal (Dumetz *et al.*, 2019).

En conclusion, les données ayant mis en évidence les bénéfices d'un régime enrichi en vitamine A sur la fonction cognitive de rongeurs âgés (Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Dumetz *et al.*, 2019) suggèrent qu'une activité optimale de la voie de signalisation de l'AR semble avoir un rôle crucial dans la préservation des capacités cognitives au cours du vieillissement. Compte-tenu des arguments suggérant des liens existants entre la baisse d'activité de la signalisation de l'AR et le développement de la pathologie Alzheimer, une stratégie de prévention de la maladie basée sur l'exposition à un régime supplémenté en vitamine A mérite d'être considérée.

D. Hypothèse et objectifs

Les données obtenues chez l'Homme indiquent que la baisse du statut en vitamine A au cours du vieillissement, qui suppose une baisse d'activité de la signalisation de l'AR cérébral, intervient dans le déclin cognitif lié à l'âge. D'autre part, les données acquises chez des patients Alzheimer, et chez les modèles animaux de la maladie impliquent également une baisse d'activité de la voie de signalisation de l'AR. Étant donnée la spécificité humaine de cette maladie, les études menées sur le vieillissement chez l'animal, renseignent rarement sur le développement spontané des lésions caractéristiques de la MA.

De plus, la carence en vitamine A induit chez le rongeur un phénotype qui ressemble étrangement à celui de rongeurs âgés, et aggrave même l'état de la neuropathologie Alzheimer de modèles de la maladie.

L'utilisation de traitements pharmacologiques thérapeutiques à base de rétinoïdes chez des modèles de la MA a fourni des résultats prometteurs dans la diminution de la pathologie Alzheimer. Cependant, avant eux, d'autres composés pharmacologiques (non-rétinoïdes) ayant également retenu l'attention de la recherche préclinique n'ont pas réussi à franchir le cap de la translation à l'Homme. De ce fait, les tentatives de guérison de la MA par voie pharmacologique ne se sont pas montrées assez convaincantes pour permettre de proposer un traitement aux patients. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'au moment où les symptômes cognitifs sont détectés, il est trop tard.

Il semblerait qu'une intervention en amont du développement des lésions caractéristiques de la maladie, qui se produit bien avant l'apparition des symptômes, soit davantage de mise. En particulier, l'emploi d'une stratégie nutritionnelle a déjà fait ses preuves chez le rongeur vieillissant, mais aucune étude n'a évalué le potentiel préventif d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A chez un modèle de la MA. À long terme, ce travail permettrait de reconsidérer le besoin en vitamine A des personnes âgées dans la deuxième partie de la vie. Ainsi, la prévention nutritionnelle en procédant par un ajustement de la prise alimentaire chez l'Homme, serait non seulement d'une grande facilité de mise en œuvre, mais également non-invasive et de faible coût.

Sur la base de tous ces éléments, l'hypothèse générale de ce projet de thèse est :

L'affaiblissement de l'activité de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque qui se produit au cours du vieillissement contribue au développement de la neuropathologie de type Alzheimer.

L'objectif général de ce projet de thèse était :

Évaluer si l'exposition à un régime enrichi en vitamine A en amont de la mise en place des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer permet de prévenir ou ralentir le développement de la neuropathologie, chez deux modèles complémentaires de la maladie.

Les modèles animaux que nous avons utilisés pour répondre à cet objectif sont le modèle d'injection i.c.v de peptides amyloïdes A β_{25-35} et la souris transgénique 3xTg-AD. Leur complémentarité tient à la balance qui existe entre les avantages et les inconvénients de chacun des modèles. En effet, le modèle d'injection i.c.v des peptides A β_{25-35} stimule la production de peptides amyloïdes par la souris (Chavant *et al.*, 2010; Lahmy *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013) et induit donc la pathologie amyloïde endogène de la souris. De ce fait, toutes les altérations ultérieures sont une conséquence plus ou moins directe de l'injection du peptide, ce qui permet une compréhension véritablement mécanistique des dérèglements liés à la production pathologique des peptides amyloïdes, et ce dans des délais très courts. Ces éléments constituent les atouts majeurs de ce modèle.

En revanche, le modèle d'injection i.c.v ne prend pas en compte le caractère progressif du développement de la MA. C'est alors que le modèle de souris transgénique 3xTg-AD montre son intérêt. En effet, il développe progressivement les pathologies amyloïde et tau humaines au cours du vieillissement et intègre de ce fait tous les aspects propres au vieillissement qui sont susceptibles d'interférer avec l'évolution de la neuropathologie (Cardillo *et al.*, 2018; Young & Franklin, 2019). De plus, l'expression des transgènes assure une stabilité et une homogénéité du développement de la neuropathologie Alzheimer, et permet de s'affranchir des aléas liés aux injections intracrâniennes, mais implique des délais beaucoup plus longs avant que le modèle ne soit prêt à l'emploi.

Ainsi, l'utilisation d'une approche d'enrichissement nutritionnel en vitamine A chez ces deux modèles, permettra d'avoir une compréhension plus complète des mécanismes d'action de la vitamine A dans la prévention de la pathogenèse d'Alzheimer.

Objectif 1 : Évaluer les effets préventifs potentiels du régime enrichi en vitamine A sur la pathologie amyloïde induite par l'injection i.c.v. de peptides A β ₂₅₋₃₅.

La réalisation de cet objectif a mené à la génération de résultats décrits dans le chapitre 1.

- **Objectif 1A : Mettre en œuvre le modèle d'injection i.c.v. de peptides A β ₂₅₋₃₅ au sein du laboratoire.**

Avant de pouvoir évaluer les effets du régime enrichi en vitamine A sur les atteintes cognitives et moléculaires induites par l'injection du peptide, il était nécessaire de réaliser la caractérisation du modèle. Notamment, identifier la cinétique des altérations comportementales suivant l'injection du peptide pour pouvoir déterminer la durée d'exposition au régime.

- **Objectif 1B : Identifier les effets bénéfiques potentiels de l'exposition au régime débutant avant l'injection intracérébrale de peptides A β ₂₅₋₃₅ et les mécanismes moléculaires sous-jacents.**

Objectif 2 : Évaluer les effets préventifs potentiels du régime enrichi en vitamine A sur les performances mnésiques et l'évolution de la neuropathologie Alzheimer chez la souris 3xTg-AD

La réalisation de cet objectif a mené à la génération de résultats décrits dans le chapitre 2.

Chapitre 1 :

ÉTUDE DES EFFETS PRÉVENTIFS D'UN RÉGIME ENRICHİ EN VITAMINE A SUR LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE INDUITE PAR L'INJECTION I.C.V DE PEPTIDES A β ₂₅₋₃₅.

Résumé

La vitamine A est un micronutriment nécessaire au maintien des processus neurobiologiques de la mémoire par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque (AR), son métabolite actif. La voie de signalisation de l'AR intervient également dans l'inhibition de la neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Après avoir validé que le modèle $A\beta$ présente une altération mnésique suite à l'injection i.c.v du peptide $A\beta_{25-35}$, nous avons pu mettre en évidence que neuf semaines de régime enrichi en vitamine A (20 UI/g), débutant trois semaines avant l'injection cérébrale du peptide $A\beta_{25-35}$ a permis d'empêcher l'altération de la mémoire spatiale de reconnaissance à court-terme en réponse à l'injection. Cet effet protecteur s'accompagnait d'une augmentation significative de l'expression génique de la *Raldh2*, l'enzyme de synthèse de l'AR, chez les souris $A\beta$ +vitA par rapport aux souris injectées avec le peptide contrôle, $A\beta_{Scrambled}$. En parallèle, la supplémentation en vitamine A a induit une diminution de l'expression hippocampique des ARNm de l'APP murine, la protéine précurseur des peptides amyloïdes. Toutefois, les mécanismes sous-jacents aux effets protecteurs des performances de mémoire n'ont pas pu être clairement identifiés.

Abstract

Vitamin A is a crucial micronutrient for the maintenance of neurobiological processes underlying the formation of memory, through the action of retinoic acid (RA), its active metabolite. RA signaling pathway is also known to be involved in the inhibition of Alzheimer's disease neuropathology. After having validated that the i.c.v injection of $A\beta_{25-35}$ does induce memory impairment in mice, we showed that nine weeks of vitamin A enriched diet (20 IU/g), starting 3 weeks before the surgery, could protect short-term spatial recognition memory from the alterations induced by the peptide. This protective effect was associated to a significant increase in the gene expression of *Raldh2*, the enzyme responsible for the synthesis of RA in the $A\beta$ +vit.A group when compared to the animals injected with the control peptide : $A\beta_{Scrambled}$ (Scb). In parallel, vitamin A supplementation decreased the hippocampal mRNA expression of murine APP, the precursor of amyloid peptides. However, the exact mechanisms underlying these protective effects on memory could not be precisely determined.

A. Introduction

La vitamine A (rétinol-*tout-trans*) est essentielle au maintien des processus de la mémoire chez l'adulte (Mey & McCaffery, 2004; Lane & Bailey, 2005; Ransom *et al.*, 2014; Stoney & McCaffery, 2016). Elle exerce son rôle par l'intermédiaire de son métabolite actif, l'acide rétinoïque (AR) (Lane & Bailey, 2005; Shearer *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Dans la cellule cible, le rétinol est métabolisé en AR sous l'action de la rétinaldéhyde désydrégénase (RALDH). Dans le cerveau, c'est la RALDH2 qui est principalement exprimée dans les méninges et dans l'hippocampe, et constitue de ce fait la principale source d'AR de cette structure cérébrale (Werner & Deluca, 2002; Lane & Bailey, 2005; Goodman *et al.*, 2012; Ransom *et al.*, 2014). L'AR ainsi produit est acheminé dans le noyau, où il est en mesure de se lier à ses récepteurs les RARs et les RXRs, des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ainsi activés, ses récepteurs régulent la transcription de gènes cibles, dont plusieurs sont impliqués dans les mécanismes de formation de la mémoire (Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001a; Lane & Bailey, 2005; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014). L'ensemble des molécules dérivant du rétinol sont communément appelés les rétinoïdes.

Un ensemble de données de la littérature plaide en faveur d'une perturbation du métabolisme de la vitamine A au cours du vieillissement chez l'Homme et chez l'animal associée à des altérations cognitives, de mémoire en particulier. Chez l'Homme, cette perturbation se manifeste par une diminution de la concentration sérique de rétinol et de l'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules mononuclées du sang, associée à des atteintes cognitives (Succari, Garric, Ponteziere, Miocque, & Cals, 1991b; Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Brtko *et al.*, 2007; Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). Chez le rongeur, ces atteintes sont également observées dans le plasma, le foie et le cerveau et s'accompagnent de perturbations de mémoires dépendantes de l'hippocampe (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001a; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Dumetz *et al.*, 2019). Or, chez le rongeur âgé, la supplémentation nutritionnelle ou pharmacologique de vitamine A a été en mesure de corriger toutes ces altérations moléculaires, métaboliques, fonctionnelles et comportementales (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001a; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Dumetz *et al.*, 2019).

En parallèle, une diminution de la concentration sérique en rétinol et de la voie de signalisation de l'AR a également été constatée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) (Bourdel-Marchasson *et al.*, 2001; Rinaldi *et al.*, 2003; Corcoran *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2008), une maladie neurodégénérative dont le principal facteur de risque est l'âge avancé (Winblad *et al.*, 2016). La MA se manifeste notamment par des atteintes importantes de mémoire (Skaper, 2012; Tromp *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2019). Son étiologie est encore mal comprise mais elle est associée à des lésions histologiques caractéristiques ; l'accumulation de peptides amyloïdes agrégés sous forme de plaques (pathologie amyloïde) et l'hyperphosphorylation anormale de la protéine tau conduisant à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (pathologie tau) (Skaper, 2012; Carrillo-Mora *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2019). De façon intéressante, il a été mis évidence que la carence en vitamine A chez le rat était associée à la formation de peptides amyloïdes dans les vaisseaux des méninges (Corcoran *et al.*, 2004) et induit des modifications morphologiques cérébrales comparables à ce qui est observé dans la MA (Ghenimi *et al.*, 2009). D'autre part, la présence de peptides amyloïdes dans le milieu de culture de microglie inhibe leur synthèse d'AR (Goncalves *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données suggèrent qu'il existerait un cercle vicieux entre la baisse d'activité de la voie de signalisation de l'AR et le développement de la pathologie amyloïde.

Malgré de nombreux essais, aucun traitement de la MA n'existe à ce jour et suppose qu'une intervention en amont du développement de la neuropathologie caractéristique d'Alzheimer est préférable. Le choix d'une stratégie nutritionnelle préventive semble particulièrement prometteuse à l'égard d'Alzheimer (Gustafson *et al.*, 2015; Ngandu *et al.*, 2015; Morris, 2016; Cremonini *et al.*, 2019).

Dans ce contexte, nous formulons l'hypothèse que la baisse d'activité de la voie de signalisation de la vitamine A qui se produit au cours du vieillissement contribue à développer la pathologie amyloïde caractéristique de la MA. Notre objectif est donc de tester si un régime enrichi en vitamine A peut permettre de prévenir le développement de cette pathologie chez le modèle d'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅ connus pour induire l'amyloïdogenèse endogène de la souris (Meunier *et al.*, 2013).

B. Matériel et méthodes

I. Animaux et régimes alimentaires

a) Souris destinées à la mise au point du modèle d'injection i.c.v.

Les animaux destinés à la mise au point du modèle d'injection i.c.v de peptides amyloïdes A β ₂₅₋₃₅ étaient des souris mâles C57BL/6 (Janvier Labs, France) âgées de 7 semaines à leur arrivée au laboratoire. Elles ont été hébergées en cages collectives de 4 animaux et ont eu un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Ces souris ont été placées sous un régime standard de laboratoire (Safe A04, Auge, France). Après une semaine d'acclimatation à leur hébergement, ces souris ont été opérées à l'âge de huit semaines pour recevoir les peptides A β ₂₅₋₃₅ dans les ventricules.

b) Souris destinées à l'évaluation des effets préventifs potentiels de la supplémentation en vitamine A

Les animaux destinés à l'évaluation des effets préventifs potentiels du régime enrichi en vitamine A étaient également des souris mâles C57BL/6 (Janvier Labs, France) âgées de 5 semaines à leur arrivée au laboratoire. De la même façon, elles ont eu un accès illimité à la nourriture et l'eau mais ont été exposées cette fois-ci à un régime contrôle contenant un apport minimal en vitamine A (5 UI/g) ou bien un régime enrichi en vitamine A (20 UI/g). Ces deux régimes sont isocaloriques et ont une composition identique à l'exception de la quantité de vitamine A qu'ils contiennent (Tableau 8). De façon à respecter la volonté de suivre une approche préventive, les souris ont débuté leur régime immédiatement à leur arrivée, soit 3 semaines avant l'injection cérébrale de peptides A β ₂₅₋₃₅.

Composition du régime	Quantité (g pour 100g de régime)
Cellulose	2
Caséine Hydrochlorique	18
Composé minéral 102	1
Vitamines (sauf vitamine A)	1
Vitamine A	5 UI ou 20 UI par g de régime
Méthionine	0,1
Amidon de maïs	45
Sucre semoule	24,9
Huile d'arachide	2,5
Huile de colza	2,5

Tableau 8 – Composition des régimes contrôle et enrichi en vitamine A

II. Chirurgie stéréotaxique intracrânienne

a) Préparation des solutions de peptides amyloïdes à injecter

Les peptides à injecter, $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{scrambled}$ (peptide contrôle), de séquence GSNKGAIIGLM et MAKGINGISGL respectivement (Synvec, France) étaient stockés sous forme de poudre à -20°C . Les acides aminés qui composent les peptides $A\beta_{25-35}$ et $A\beta_{scrambled}$ sont les mêmes, cependant dans le cas du peptide contrôle ($A\beta_{scrambled}$), la séquence des acides aminés limite significativement l'agrégation du peptide. Conformément au protocole de Maurice *et al.* 2013, les peptides ont été dilués dans de l'eau distillée stérile et placés à 37°C pendant quatre jours pour leur permettre d'atteindre un plateau d'agrégation avant d'être injectés (Meunier *et al.*, 2013). La concentration des solutions d'injection était de 3 mg/ml et chaque souris a reçu 3 μl , soit l'équivalent de 9 μg de peptides $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{scrambled}$.

b) Injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$

Les animaux ont été soumis à une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (4-5%) dans une boîte à induction prévue à cet effet. Aussitôt après avoir perdu connaissance, les animaux ont été placés sur le cadre stéréotaxique équipé d'un masque diffusant de l'isoflurane (1,5-2%) en continu au niveau du museau de la souris pendant toute la durée de l'opération. Les souris ont reçu une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,05 mg/kg) et de tolfédine (10 mg/kg), des analgésiques opioïde et anti-inflammatoire respectivement, dans le but de réduire la douleur de l'animal pendant et après la chirurgie. Les poils de la tête ont été coupés et la tête nettoyée à la Bétadine®. Une injection unique i.c.v. unilatérale de peptides $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{scrambled}$ (contrôles) a été réalisée dans le ventricule latéral gauche ou droit aléatoirement, lorsque les souris étaient âgées de 8 semaines. Les coordonnées d'injection utilisées étaient : -0,22 mm par rapport au Bregma ; latéralité de +/- 0,8 mm et profondeur - 2,25 mm à partir de la surface du cerveau. Ces coordonnées avaient été préalablement vérifiées à l'aide d'une injection d'encre pour s'assurer de la délivrance au bon endroit (Fig. 14). Pour ce faire, nous avons eu recours à un système de pompe (UMP III, MicroSyringe

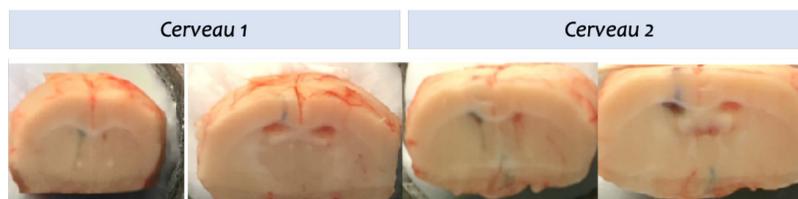


Figure 14 – Photographies de cerveaux ayant permis de contrôler la validité des coordonnées choisies pour l'injection dans le ventricule latéral.

Pump, WPI, France) et des seringues Hamilton (NanoFil Syringe™ de 10 µl, aiguille 26G, WPI, France). Avant de procéder à l'injection dans le cerveau des souris, la seringue Hamilton était saturée en peptides au moyen de plusieurs remplissages consécutifs grâce à un aliquot spécialement prévu à cet effet. Le débit de délivrance des peptides était fixé à 0,5 µl/min et le volume injecté était de 3 µl. Une fois le volume délivré, la seringue a été laissée en place pendant cinq minutes additionnelles avant d'être retirée afin de permettre à la solution injectée de diffuser dans le LCR. Puis, le crâne a été suturé et une pommade analgésique locale (Lidocaïne 2%) a été appliquée de façon à réduire la douleur et l'automutilation des souris. À l'issue de la chirurgie, les souris ont été placées en cages individuelles jusqu'à leur réveil complet, en présence de croquettes humidifiées. Une fois qu'elles ont retrouvé une activité normale (quelques heures), elles sont retournées dans leur cage collective. Les souris ont été pesées pendant les trois jours suivant leur opération afin de s'assurer de leur bonne récupération et permettre le suivi post-opératoire.

III. Évaluations comportementales

En amont des évaluations comportementales, les souris ont été manipulées à raison de deux à trois fois par jour pendant trois jours, de façon à réduire le stress dû à prise en main par l'expérimentateur.

a) Le labyrinthe en Y

Ce test de comportement s'appuie sur la propension innée des rongeurs à explorer la nouveauté. Le protocole du labyrinthe en Y utilisé se déroulait en deux phases et évalue la mémoire spatiale de reconnaissance (Dellu et al., 2000). Lors de la phase 1 (acquisition), la souris a été placée dans le bras de départ, déterminé au hasard pour chaque souris, et ne pouvait explorer que deux bras du labyrinthe pendant cinq minutes, l'accès au troisième bras étant empêché par une porte. À l'issue de la phase 1, la souris est remise dans sa cage d'hébergement pendant une heure. Lors de la phase 2 (test), d'une durée de cinq minutes également, elle a été replacée dans le même bras de départ et a cette fois-ci eu accès au troisième bras ; le bras nouveau (Fig. 15). À l'aide des indices spatiaux présents dans la pièce, la souris était censée reconnaître les bras qu'elle a déjà visités et devait donc explorer davantage le bras nouveau.

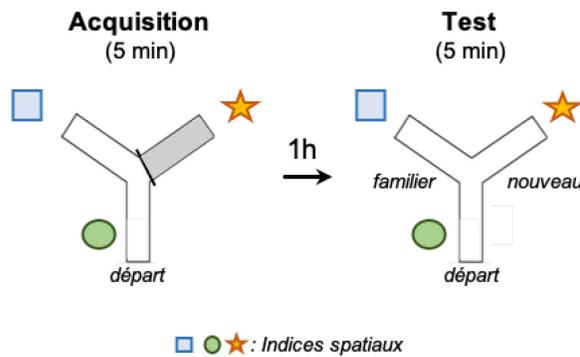


Figure 15 – Protocole d’évaluation de la mémoire spatiale de reconnaissance dans le labyrinthe en Y (court-terme).

b) La reconnaissance d’objet

De la même façon que le labyrinthe en Y, le test de la reconnaissance d’objet repose sur la curiosité naturelle des rongeurs. Lors de la phase d’acquisition, les souris ont eu la possibilité d’explorer deux objets identiques, puis étaient replacées dans leur cage d’hébergement. 24 heures plus tard, pour la phase de test, l’objet de gauche ou de droite a été aléatoirement remplacé par un nouvel objet, jamais vu par la souris. Au cours de ces deux phases, le critère de 20 secondes d’exploration totale des deux objets a été fixé, sur la base du protocole de Léger *et. al* 2013 (Leger et al., 2013) (Fig. 16). Ce critère permet de s’affranchir du biais lié à la différence d’exploration des souris, mais aussi de déterminer l’exploration relative de chaque objet. Ainsi, le temps d’exploration de l’objet nouveau est significativement supérieur à 10 secondes (hasard) lorsque la souris a été capable de reconnaître l’objet nouveau. Les souris disposaient d’un maximum de 10 minutes pour atteindre ce critère d’exploration dans les deux phases, faute de quoi elles ont été exclues

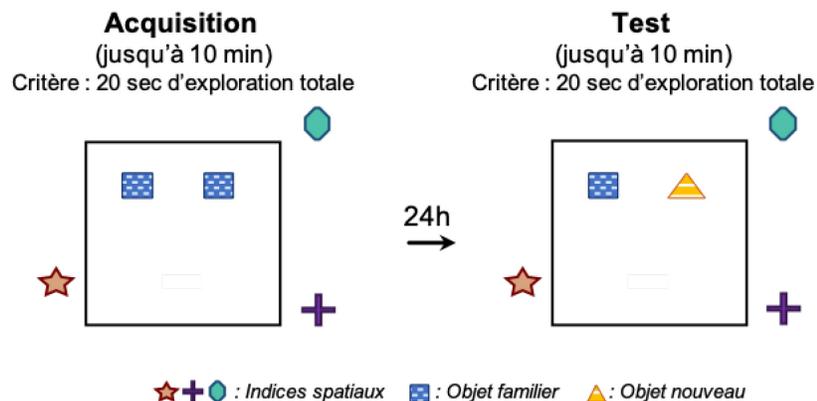


Figure 16 – Protocole d’évaluation de la mémoire de reconnaissance dans le test de la reconnaissance d’objet (long-terme).

de l'analyse. Les paires d'objets utilisées étaient une bouteille de 50 ml à bouchon bleu et une pile de Légo multicolore, ou bien une flasque de culture cellulaire de 25 cm³ remplie de litière et un cylindre en plastique de couleur orange et verte.

c) La piscine de Morris

La piscine de Morris est un test très couramment utilisé pour l'évaluation de la mémoire spatiale (Morellini, 2013) qui repose sur l'hippocampe (McCaffery *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017). Ce test s'appuie sur l'aversion naturelle des souris pour l'eau. Il consiste en une phase d'apprentissage et une phase de test (Fig. 17).

Au cours de l'apprentissage, les souris doivent apprendre à mémoriser la localisation d'une plateforme immergée dans un bassin rempli d'eau (1,5 mètre de diamètre). De la peinture blanche est ajoutée à l'eau pour la rendre opaque, afin d'empêcher que les souris repèrent visuellement la plateforme, mais se servent bien des indices spatiaux de la pièce pour y parvenir. Pendant cinq jours consécutifs, les souris ont eu 6 essais par jour pour apprendre à localiser cette plateforme, en partant de points de départ différents à chaque fois. À chaque essai, elles disposaient de 90 secondes pour la trouver, sans quoi, elles y étaient guidées.

Le jour du test, 72 heures après le dernier jour d'apprentissage, la plateforme est retirée du bassin. La souris est introduite dans la piscine pour une durée totale de 60 secondes, au départ d'un point duquel elle n'est jamais partie auparavant. Grâce au logiciel de vidéo-tracking (Smart v. 2.0), la piscine est virtuellement découpée en quatre quadrants, dont l'un d'eux contenait jusque-là la plateforme en son centre. Ce quadrant est appelé « quadrant cible ». Le temps passé et la distance parcourue dans ce quadrant cible, au cours des 60 secondes du test, sont indicateurs de la mémorisation des souris de la location de la plateforme.

En amont de l'apprentissage, une évaluation des capacités visuelles des souris a été réalisée afin de s'assurer qu'aucun groupe expérimental n'était atteint de troubles visuels.

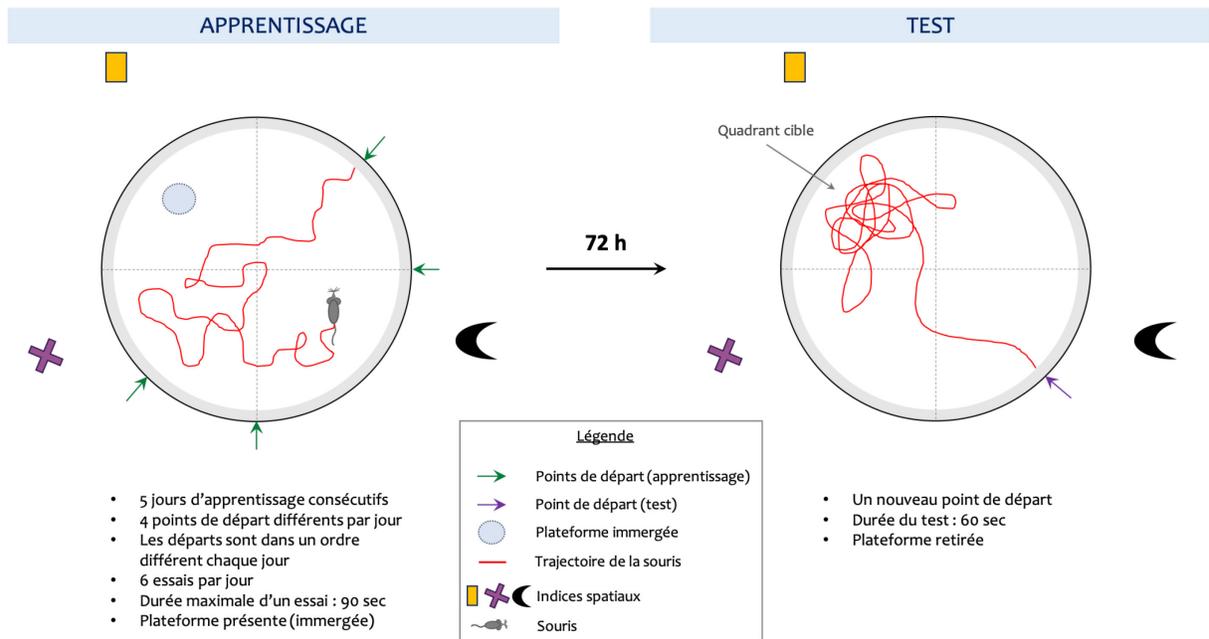


Figure 17 – Schéma descriptif du protocole suivi pour le test de la piscine de Morris.

d) Le labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé permet d'évaluer le comportement de type anxieux des souris. Il s'agit d'un labyrinthe en croix, dont deux bras opposés sont pourvus de hautes parois opaques et les deux autres bras opposés en sont dépourvus. Ce labyrinthe étant suspendu à environ un mètre du sol, les bras dépourvus de parois, dits « ouverts », sont anxiogènes car au-dessus du vide. Les bras fermés sont de ce fait un refuge pour les animaux. Les souris ont été placées dans le labyrinthe au croisement des quatre bras, le museau dirigé vers un bras ouvert et ses déplacements dans le labyrinthe pendant cinq minutes ont été enregistrés. Plus une souris osait s'aventurer dans les bras ouverts, moins son niveau d'anxiété était élevé.

e) La boîte à compartiments éclairé et sombre

L'utilisation de ce dispositif est un autre moyen d'évaluer le comportement de type anxieux des souris. Les deux compartiments éclairé et sombre sont séparés par une paroi contenant une petite ouverture permettant à la souris de passer de l'un à l'autre (Fig. 18). La partie éclairée était soumise à une forte luminosité anxiogène (environ 200 lux). Les souris ont été introduites par le compartiment sombre et disposaient de 10 minutes pour explorer le dispositif. Plus elles se risquaient à aller dans le compartiment éclairé, moins leur niveau d'anxiété était élevé.

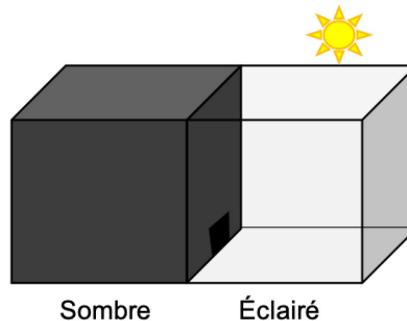


Figure 18 – Boîte à compartiments éclairé/sombre.

IV. Euthanasie

Au terme des évaluations comportementales ayant eu lieu à différents temps après l'injection cérébrale, les souris ont été euthanasiées. Elles ont été soumises à une anesthésie profonde à l'isoflurane puis, une perfusion intracardiaque a été réalisée de façon à récupérer le sang des animaux. Le plasma des souris a été obtenu suite à la centrifugation des échantillons de sang à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Les hippocampes ont été prélevés et immédiatement congelés dans la carboglace. En raison de l'oxydation très rapide des rétinoïdes au contact de la lumière blanche, les euthanasies se sont déroulées sous lumière rouge.

V. Investigations moléculaires

a) Dosage des peptides A β murins produits

Les échantillons d'hippocampe ont été homogénéisés dans 550 μ l de tampon N-PER™ (ThermoFisher, France) auquel des inhibiteurs de phosphatases et de protéases ont été ajoutés. Après sonication pendant 10 secondes dans la glace, ils ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et soumis à un dosage de quantification protéique BCA (MicroBCA™, ThermoFisher, France). Puis, la quantité de peptides amyloïdes A β ₄₀ a été dosée à l'aide d'un kit ELISA prévu à cet effet (Wako référence 294-64701 et 290-62601, Fujifilm, Japon) selon les instructions du protocole fourni dans le kit. Brièvement, le fond de la plaque 96 puits est tapissée d'anticorps anti-A β ₄₀ permettant de retenir les peptides A β ₄₀ contenus dans les échantillons de souris, par leur extrémité N-terminale. Après lavage, un autre anticorps anti-A β ₄₀ se lie à la partie C-terminale du peptide. Ce deuxième anticorps est couplé à la peroxydase de raifort, la HRP (Horseradish peroxidase), une enzyme à activité oxydase. La mise en présence de la HRP avec son substrat conduit à la production de lumière, proportionnellement à la quantité de HRP présente. L'intensité de la lumière produite, mesurée par absorbance à 450 nm, reflète la concentration de peptides A β ₄₀ présents dans chaque puits.

b) Mesure du rétinol plasmatique

Les échantillons de plasma collectés lors de l'euthanasie des souris ont été dilués dans un mélange d'hexane et d'hydroxytoluène butylé (BHT), après l'ajout d'un standard interne contenant de l'acétate de tocophérol. Puis, les échantillons ont été centrifugés à 12 000 rpm pendant 3 minutes à température ambiante, et évaporés sous azote. Enfin, le résidu sec contenant le rétinol a été resuspendu dans du méthanol et la concentration de rétinol présente dans chaque échantillon a pu alors être déterminée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) à détection UV (Marissal-Arvy *et al.*, 2013).

c) Dosage de la corticostérone plasmatique

La corticostérone plasmatique a été quantifiée dans le plasma issu d'échantillons de sang prélevés à la veine mandibulaire des souris en conditions basales. Un prélèvement a eu lieu en début de phase inactive à 8h00 du matin et l'autre en début de phase active, à 19h00 le soir. L'ensemble des souris d'une même cage ont été prélevées en moins de quatre

minutes. Le dosage de la corticostérone totale a été réalisé à l'aide d'un radio-immuno-assay selon le protocole décrit par Richard *et. al* 2010 (Richard et al., 2010). Ce dosage repose sur la compétition entre la corticostérone endogène froide et la corticostérone tritiée pour un anticorps anti-corticostérone généreusement offert par le Dr. H Vaudry. La mesure d'une plus grande radioactivité reflète une plus faible quantité de corticostérone présente dans l'échantillon.

d) Expression génique

Les ARNs totaux ont été extraits des hippocampes à l'aide des réactifs TRIzol Reagent™ (Invitrogen, Saint Aubin, France). La qualité des ARNs et leur concentration ont été obtenues à l'aide du spectromètre Nanodrop (NanoDrop™ technologies, Fisher Scientific) et du kit de puces à ARN NanoLabChip pour Bioanalyzer (Agilent Technologies). Puis, 1 µg d'ARN a été rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Ces ADNc ont servi à réaliser la Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative en temps réel (RTqPCR) avec le système du LightCycler 480 (Roche Diagnostic). Pour cela, les ADNc ont été mis en présence de couples d'amorces spécifiques d'un gène d'intérêt et de sondes fluorescentes (SYBR Green). Ainsi, le gène d'intérêt est amplifié proportionnellement à la quantité d'ARNm initialement présente dans l'échantillon, et génère de la fluorescence à mesure de l'amplification. Plus le nombre de cycles nécessaires à la détection de la fluorescence est élevé, moins l'échantillon était concentré en ARN du gène d'intérêt. Dans ce protocole, nous avons mesuré l'expression génique des récepteurs de l'AR (RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β et RXR γ), de l'enzyme de synthèse de l'AR (la RALDH2), des enzymes impliquées dans la transformation de l'APP (APP, ADAM10, BACE1, IDE, PS1, PS2) et de protéines impliquées dans l'activité de l'axe Hypothalamo-Pituitaire-Adrénalien (HPA) (les récepteurs des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes, MRs et GRs respectivement, la *serum and glucocorticoid regulated kinase 1* (Sgk1) et la *11 β -hydroxy-steroid-dehydrogenase type 1* (11 β -HSD1)). L'expression de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence de l'actine et de la GAPDH dont l'expression ne variait pas entre les groupes, grâce au logiciel GenEx™ MultiD (Göteborg, Suède).

VI. Analyse statistique

Les données sont représentées sous la forme de la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne. Le seuil de significativité statistique a été établi à $p < 0.05$.

Préalablement à la comparaison de groupes entre eux, une analyse de l'égalité des variances des différents groupes a été réalisée avec le test de Bartlett.

Dans le cas où les variances étaient égales, la comparaison de deux groupes a été réalisée avec un test de T non-apparié. La comparaison de plus de deux groupes a été réalisée avec le test de l'ANOVA, qui comprend l'étude des effets d'un ou plusieurs facteurs, tels que le peptide injecté, le régime alimentaire reçu, ou l'effet du temps. Une interaction significative entre plusieurs facteurs a donné lieu à une analyse subsidiaire post-hoc avec le test de Tukey, sauf dans le cas d'une analyse en mesures répétées. Dans ce cas, suite à l'interaction significative entre la répétition de la mesure et un ou plusieurs autres facteurs, l'analyse a été reprise depuis le début, individuellement pour chaque mesure ayant été incluse dans l'analyse de mesures répétées.

Dans le cas où le test de Bartlett révélait une inégalité des variances, la comparaison de deux groupes a été permise par le test de Mann-Whitney, et la comparaison de plus de deux groupes avec le test de Kruskal-Wallis. Lorsque le test de Kruskal-Wallis était significatif, l'analyse post-hoc qui s'ensuivait a été accomplie avec le test de Dunn.

Dans le but de comparer la moyenne de chaque groupe à une valeur théorique de référence, c'est le One-sample-T-test qui a été utilisé.

Enfin les corrélations entre différentes variables ont été obtenues grâce à la modélisation d'une régression linéaire des variables, et le coefficient de détermination provient de la corrélation de Pearson.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel JMP (version 14.0 SAS Institute, Cary, IL, USA) et Prism 7 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

C. Résultats

I. Mise au point du modèle d'injection i.c.v : évaluations comportementales.

a) Atteintes mnésiques

Sur la base des données de la littérature, de nombreux types de mémoires sont altérés en réponse à l'injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$: la mémoire de travail, la mémoire de reconnaissance ou la mémoire spatiale (Maurice, Lockhart, & Privat, 1996; Maurice, Lockhart, Su, *et al.*, 1996; Chavant *et al.*, 2010; Isono *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013; Wang, Chen, Li, *et al.*, 2015). Les protocoles utilisés pour évaluer les performances de mémoires modélisent souvent la mémoire épisodique de l'Homme, qui est l'une des premières à être perturbée dans la maladie d'Alzheimer (Morellini, 2013; Tromp *et al.*, 2015; Wahl *et al.*, 2017). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser des paradigmes permettant l'évaluation de la mémoire épisodique dans les tests du labyrinthe en Y et de la reconnaissance d'objet. Les protocoles utilisés avaient déjà été validés au sein du laboratoire où ils sont couramment utilisés.

Après une semaine d'acclimatation à l'animalerie, les souris âgées de 8 semaines, ont reçu une injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$ ou $A\beta_{Scrambled}$, nommées $A\beta$ et Scb respectivement dans la suite de ce chapitre. Elles ont été soumises aux évaluations comportementales après une semaine de récupération post-opératoire,

Nous avons pu constater qu'une semaine après l'injection de peptide, les souris Scb étaient capables de reconnaître le bras nouveau du labyrinthe en Y et passaient significativement plus de temps à l'explorer par rapport aux deux autres bras. En revanche, le temps passé par les souris $A\beta$, à explorer chaque bras n'était pas différent du hasard, ce qui indique qu'elles étaient incapables de discriminer les bras familier et nouveau (Fig. 19A). Concernant la mémoire de reconnaissance, les deux groupes de souris ont été capables d'atteindre le critère d'inclusion dans l'analyse ; soit les 20 secondes d'exploration totale des deux objets (Fig. 19B). Cependant, pendant la phase de test, aucun d'eux n'a été capable de reconnaître l'objet nouveau (Fig. 19C). Les performances observées dans ces deux tests n'étaient pas associées à une différence du niveau d'anxiété entre les groupes $A\beta$ et Scb, comme le montre la Fig. 19D. En effet, le temps passé dans les bras ouverts et fermés du labyrinthe en croix surélevé était équivalent.

Ainsi, une semaine après l'injection des peptides, la mémoire de reconnaissance spatiale à court-terme était conservée chez les Scb uniquement tandis que la mémoire de reconnaissance à long-terme était perturbée chez ces souris. Chez les souris A β , aucune de ces deux mémoires n'a été préservée.

Trois semaines après l'injection i.c.v des peptides, les souris Scb ont conservé leur capacité à reconnaître le bras nouveau du labyrinthe en Y pendant la phase de test, contrairement aux souris A β , qui en étaient toujours incapables (Fig. 19E). Dans le test de la reconnaissance d'objet, malgré une bonne exploration des objets en phase d'acquisition (Fig. 19F), ni le groupe Scb, ni le groupe A β ne parvenaient à distinguer l'objet nouveau (Fig. 19G), bien qu'une amélioration ait été constatée par rapport à l'évaluation une semaine après l'injection. De nouveau, le comportement de type anxieux ne distinguait pas ces deux groupes, étant donné qu'ils exploraient de façon similaire les compartiments éclairé et sombre (Fig. 19H).

Par conséquent, les conclusions qui émergent concernant les altérations comportementales induites par l'injection des peptides A β_{25-35} ou A $\beta_{Scrambled}$ sont sensiblement les mêmes à une semaine et à trois-semaines post-injection.

Enfin, cinq semaines après l'opération intracrânienne, les souris Scb, tout comme les souris A β , n'ont pas réussi à identifier le bras nouveau (Fig. 19I). En revanche, elles ont pu différencier l'objet nouveau de l'objet familier (Fig. 19K), après avoir correctement exploré les objets identiques (Fig. 19J). Le comportement de type anxieux n'a pas été réévalué à ce stade.

b) Quantification des peptides amyloïdes endogènes A β_{40} et A β_{42} en réponse à l'injection.

Nous avons pu quantifier chez un petit nombre de souris, la quantité de peptides amyloïdes murins générés dans l'hippocampe des souris Scb et A β . Nous avons observé qu'une semaine après l'opération, la quantité de peptides A β_{40} murins était fortement diminuée chez les souris A β alors qu'elle tendait à augmenter trois semaines après l'injection (Fig. 20A, 20B). La quantité de peptides A β_{42} murins formés a pu être dosée uniquement trois semaines après l'injection intracrânienne. Bien que nous observions une élévation importante de la quantité de peptide A β_{42} dans l'hippocampe des souris A β par rapport aux souris Scb, cette différence n'atteint pas le seuil de significativité. On peut supposer que le nombre de souris utilisées pour ce dosage est trop petit (Fig. 20C).

Pour la suite du projet, sur la base des résultats obtenus, il nous a semblé opportun de conserver le labyrinthe en Y pour évaluer la mémoire des souris en réponse à l'injection, mais pas le test de la reconnaissance d'objet. En effet, le fait que les souris Scb ne soient pas capables de reconnaître l'objet nouveau à une semaine, ni à trois semaines après l'injection ne permet pas de les considérer comme de bons contrôles vis-à-vis des souris A β . En revanche, la mémoire spatiale de reconnaissance à court-terme est restée intacte chez les souris Scb jusqu'à 3 semaines après l'injection, ce qui n'était plus le cas après cinq semaines.

Nous avons considéré que trois semaines après l'injection, était un délai nécessaire et suffisant pour que les effets du peptide injecté sur les capacités mnésiques des animaux soient mesurables sans interférences avec les conséquences propres à la chirurgie. De plus, la mesure de la quantité de peptides amyloïdes hippocampiques produits semble indiquer qu'après ce délai les souris présenteraient aussi des altérations moléculaires de type Alzheimer.

II. Étude des effets préventifs potentiels d'un régime enrichi en vitamine A sur la pathologie amyloïde induite par l'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅.

a) La supplémentation en vitamine A préserve la mémoire spatiale de reconnaissance des souris injectées avec le peptide A β ₂₅₋₃₅.

L'exposition au régime enrichi ou non en vitamine A a débuté 3 semaines avant l'injection intracrânienne (à l'âge de 8 semaines) et s'est poursuivie jusqu'à la fin du protocole expérimental (Fig. 21).

Trois semaines après l'injection du peptide dans les ventricules, nous avons observé que les souris A β sous régime contrôle présentaient une altération de la mémoire spatiale de reconnaissance dans le labyrinthe en Y, ce qui est conforme aux données obtenues lors de la caractérisation comportementale du modèle. Leur exploration du bras nouveau n'était pas statistiquement différente d'une exploration due au hasard (Fig. 22A). Cependant, le régime enrichi en vitamine A a pu préserver les capacités de mémoire des souris A β +Vit.A dans le labyrinthe en Y. En effet, leur exploration du bras nouveau était très significativement

supérieure à la valeur théorique d'une exploration due au hasard (Fig. 22A). Les souris Scb, quel que soit le régime reçu, ont également été en mesure de réaliser cette tâche mnésique. Le ratio de discrimination (DR) permet de comparer l'exploration des bras familier et nouveau, indépendamment du bras de départ, sur la base de la distance parcourue dans les bras. Les valeurs de DR obtenues pour chaque groupe confirment que seul le groupe A β ne présentaient pas de bonnes performances de mémoire dans ce test (Fig. 22B). Toutefois, la latence à entrer dans le bras nouveau était équivalente chez tous les groupes (Fig. 22C). Le peptide injecté et le régime reçu n'ont pas non plus influencé le comportement de type anxieux de ces souris, évalué par le temps relatif passé dans les bras ouverts et fermés du labyrinthe en croix surélevé (Fig. 22D). De même, la latence à entrer dans un bras ouvert du labyrinthe en croix n'a pas été influencée par le régime ni par le peptide reçu (Fig. 22E).

Sachant que le phénotype des souris A β est altéré dans le labyrinthe en Y, qui évalue une mémoire spatiale à court-terme, nous avons également évalué leur mémoire spatiale à long-terme, en utilisant le paradigme de la piscine de Morris. Nous n'avons pas observé d'effet du peptide injecté sur les capacités d'apprentissage des souris, elles ont toutes été capables d'apprendre la localisation de la plateforme de façon équivalente. Cependant, un effet significatif du régime enrichi en vitamine A a été observé sur l'efficacité d'apprentissage (ANOVA-2-facteurs en mesures répétées : interaction jour d'apprentissage x régime $p=0.0244$) (Fig. 22F). L'analyse subsidiaire de cette interaction a révélé une différence entre les souris supplémentées et non-supplémentées au deuxième jour d'apprentissage seulement (Mann-Whitney : 5UI vs. 20 UI, $p=0.023$).

Le jour du test, 72 heures après le dernier jour d'apprentissage, tous les groupes expérimentaux ont parcouru une distance significativement plus importante dans le quadrant cible (Fig. 22G). Ceci indique que tous les groupes ont pu se souvenir de la localisation passée de la plateforme. Le groupe A β s'est démarqué en parcourant une distance plus importante encore que ses congénères.

Ensemble, nos résultats indiquent que l'injection i.c.v du peptide A β_{25-35} perturbe la mémoire spatiale à court-terme sans affecter le comportement de type anxieux, conformément à ce qui avait été obtenu lors de la caractérisation comportementale du modèle. Cependant, elle ne perturbe pas la mémoire spatiale à long terme. La supplémentation en vitamine A a pu exercer un effet protecteur sur l'altération de la mémoire spatiale à court-terme induite par l'injection du peptide.

b) L'injection de peptides A β ₂₅₋₃₅ et l'activité de l'axe HPA.

Une hyperactivité de l'axe Hypothalamo-Pituitaire-Adrénalien (HPA), impliqué dans la régulation de la réponse au stress, a été décrite chez des patients Alzheimer (Swanwick *et al.*, 1998; Vyas & Maatouk, 2013; Canet *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2019) et constitue un facteur de risque de déclarer la MA (Jaroudi *et al.*, 2017; Caruso *et al.*, 2018; 2019). Il a été rapporté que l'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅ induit chez le rat une hyperactivité de cet axe (Zussy *et al.*, 2011; Brureau *et al.*, 2013; Zussy *et al.*, 2013; Pineau *et al.*, 2016). Or, l'activité de l'axe HPA est régulée par la voie de signalisation de l'AR (Aubry & Odermatt, 2009; Marissal-Arvy *et al.*, 2013; Bonhomme, Minni, *et al.*, 2014; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Brossaud *et al.*, 2017; Bonhomme *et al.*, 2019), en exerçant notamment une action modératrice.

Nous avons donc évalué si l'injection de peptides A β ₂₅₋₃₅ avait un impact sur l'activité de l'axe de notre modèle et si le régime enrichi en vitamine A pouvait l'empêcher.

Nous avons observé qu'en conditions basales, le peptide et le régime reçus n'influencent pas la concentration circulante de corticostérone des animaux au début des phases inactive et active (Fig. 23A). Cependant, il y a une tendance de la supplémentation en vitamine A à augmenter cette concentration au début de la phase active (ANOVA-2-facteurs : effet du régime, $p=0.0603$). La mesure de l'expression génique dans l'hippocampe des récepteurs MRs et GRs, de la *serum and glucocorticoid regulated kinase 1* (Sgk1) et de la *11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 1* (11 β -HSD1), tous impliqués dans la régulation de l'axe HPA, n'a pas révélé de différence entre les groupes expérimentaux (Fig. 23B). Toutefois, la supplémentation en vitamine A tend à diminuer l'expression hippocampique de la 11 β -HSD1, une enzyme qui régénère la forme active de la corticostérone (Dammann *et al.*, 2019) (ANOVA-2-facteurs : effet du régime, $p=0.083$).

Malgré le fait que l'ensemble des groupes semble présenter la même activité de l'axe HPA, la relation qui lie l'expression hippocampique de la 11 β -HSD1 et la distance parcourue dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé est forte chez les souris Scb et absente chez les souris A β , indépendamment du régime reçu (Fig. 23C). Chez les souris Scb, le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe est très fortement inversement corrélé à l'expression hippocampique de la 11 β -HSD1. Chez les souris A β , cette corrélation n'est pas statistiquement significative.

Ainsi, le peptide $A\beta_{25-35}$ n'a pas induit d'altération caractérisée de l'activité de l'axe HPA, et le régime enrichi en vitamine A n'a pas non plus eu d'incidence notable sur l'activité de cet axe.

c) La supplémentation en vitamine A améliore la production hippocampique d'AR des souris $A\beta$.

Afin de caractériser l'activité de la voie de signalisation de l'AR des souris Scb et $A\beta$, nous avons mesuré la concentration sanguine de rétinol, l'expression génique des récepteurs de l'AR (les RARs et les RXRs) ainsi que l'enzyme de synthèse de l'AR, la RALDH2, dans l'hippocampe.

La concentration plasmatique de rétinol est augmentée par la supplémentation en vitamine A (ANOVA-2-facteurs : effet du régime, $p=0.0213$) (Fig. 24A). L'injection de peptides $A\beta_{25-35}$ n'a pas d'effet sur le niveau de rétinol sanguin.

L'expression des RARs semble être diminuée chez les souris $A\beta$ mais seule l'expression du récepteur $RAR\gamma$ est sujette à une interaction peptide x régime (ANOVA-2-facteurs : interaction peptide x régime, $p=0.053$). Le seuil de significativité statistique n'étant pas atteint, la comparaison des groupes entre eux n'est pas de mise, ni pour les RARs, ni pour les RXRs (Fig. 24B). En revanche, nous avons obtenu une forte interaction peptide x régime concernant l'expression hippocampique de l'enzyme de synthèse de l'AR, la RALDH2 (ANOVA-2-facteurs : peptide x régime, $p=0.0019$). L'analyse post-hoc a révélé que l'expression de RALDH2 dans le groupe $A\beta$ +vit.A était significativement supérieure à celle des groupes Scb+vit.A et $A\beta$ (Fig. 24B). Ces données montrent que la supplémentation en vitamine A est capable de réduire la production d'AR chez les souris Scb tandis qu'elle l'augmente chez les souris $A\beta$. Par ailleurs, l'expression de cette enzyme est fortement corrélée à l'activité exploratoire du bras nouveau dans le labyrinthe en Y chez les souris $A\beta$ et tend à avoir l'effet opposé chez les souris Scb (Fig. 24C).

L'analyse de l'expression de six gènes impliqués dans la production et l'accumulation des peptides amyloïdes ne révèle pas d'effet du peptide injecté (Fig. 24D). Une tendance est observée concernant l'expression d'ADAM10 qui semble plus faible chez les souris $A\beta$ comparativement aux souris Scb (ANOVA-2-facteurs : effet du peptide, $p=0.0683$), mais à nouveau, le seuil de significativité statistique n'est pas atteint. En revanche, le régime enrichi en vitamine A a induit une diminution significative de l'expression de l'APP695 des souris supplémentées (ANOVA-2-facteurs : effet du régime, $p=0.0133$). Il apparaît que cet effet est

en grande partie dû à la diminution observée dans le groupe A β +vit.A. L'expression d'aucun des autres gènes étudiés n'a été influencée par l'apport de vitamine A. Une interaction significative des facteurs peptide et régime a été obtenue pour l'expression de PS1, la sous-unité catalytique de la γ -secrétase, mais l'analyse post-hoc n'a pas permis de discriminer les groupes significativement (ANOVA-2-facteurs : interaction peptide x régime, $p=0.0413$).

De façon intéressante, nous avons observé que lorsque les animaux ne sont pas séparés selon le peptide ou le régime qu'ils ont reçu, l'expression des ARNm de tous les RARs est corrélée à l'expression hippocampique des ARNm d'ADAM10 et d'IDE (Tableau 9). Cette corrélation est particulièrement importante et significative pour les récepteurs RAR α et RAR γ (Fig. 24E, 24F).

Ainsi, nos résultats suggèrent que le régime enrichi en vitamine A a pu stimuler la production d'AR dans l'hippocampe des souris A β +Vit.A, via une élévation de l'expression génique de son enzyme de synthèse, la Raldh2. Cette augmentation d'expression était corrélée positivement aux performances des souris injectées avec le peptide A β_{25-35} (A β et A β +Vit.A) dans le labyrinthe en Y. Enfin, le peptide A β a légèrement diminué l'expression d'ADAM10 dans l'hippocampe et le régime enrichi en vitamine A a diminué l'expression des ARNm du précurseur des amyloïdes (APP), mais surtout l'expression des RARs corrélait positivement avec l'expression des enzymes ADAM10 et IDE dans l'hippocampe de tous les groupes confondus.

La figure 25 présente un schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le modèle de souris A β -injectées.

D. Discussion

I. La caractérisation comportementale des souris A β .

L'étude des atteintes mnésiques lors de la mise au point du modèle a révélé que dans le test de la reconnaissance d'objet, les souris Scb n'ont pas réussi à réaliser la tâche à une et trois semaines après l'injection i.c.v, malgré une bonne exploration des objets à l'acquisition. Nous n'avons pas procédé à une phase d'habituation en amont de la phase d'acquisition dans ce test, contrairement à ce qui est fait dans la littérature (Isono *et al.*, 2013; Lahmy *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013), ce qui peut expliquer leurs mauvaises performances. Le fait que les souris A β , quant à elles, soient également perturbées dans la

reconnaissance d'objet était un résultat attendu car il a déjà été rapporté (Lahmy *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013).

En revanche, les souris Scb ont pu conserver une bonne mémoire spatiale à court terme dans le labyrinthe en Y à une semaine et trois semaines après l'injection, mais pas à cinq semaines. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'à la troisième exposition au labyrinthe en Y, celui-ci soit devenu familier pour ces souris au point qu'elles ne fassent plus la différence entre bras familier et nouveau. Dans le même temps, les souris A β étaient perturbées dans ce test à chaque exposition au labyrinthe en Y. Ceci est cohérent avec les données obtenues par Zussy *et al.*, qui ont utilisé un protocole de T-maze similaire au nôtre chez le rat et qui ont révélé des perturbations dans ce test à 1, 2, 3 et 6 semaines après l'injection (Zussy *et al.*, 2011; 2013).

Enfin, le comportement de type anxieux n'a pas été impacté par l'injection du peptide A β chez notre modèle, contrairement aux travaux de Brureau *et al.* 2012, qui montraient une diminution du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix à une et deux semaines après l'injection mais pas à trois semaines (Brureau *et al.*, 2013).

Sur la base de ces résultats et des données moléculaires obtenues, nous avons considéré que l'utilisation du test du labyrinthe en Y, trois semaines après l'injection du peptide, semblait réunir les conditions expérimentales les plus adaptées pour constituer notre modèle de base, avant d'évaluer les effets potentiellement bénéfiques d'une supplémentation nutritionnelle en vitamine A sur les atteintes induites par le peptide A β_{25-35} .

II. La préservation de la mémoire des souris A β par le régime enrichi en vitamine A

La supplémentation nutritionnelle en vitamine A s'est montrée bénéfique chez les souris injectées avec le peptide A β_{25-35} pour le maintien de leurs performances dans le labyrinthe en Y. Ce résultat est concordant avec les données de la littérature qui montrent que la vitamine A administrée par voie alimentaire a un effet bénéfique sur le déclin de mémoire au cours du vieillissement chez les souris et les rats (Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Dumetz *et al.*, 2019). C'est cependant la première fois, à notre connaissance, que l'utilisation d'une approche nutritionnelle impliquant de la vitamine A est utilisée chez un modèle de la MA.

En revanche, l'effet bénéfique de la vitamine A n'est pas observé lorsqu'on utilise le paradigme de la piscine de Morris. En effet, dans ce test, les souris A β_{25-35} sous régime

contrôle n'ont pas été perturbées dans leur apprentissage, ni dans la phase de test de la mémoire. Ce résultat est contraire aux données obtenues dans plusieurs études, montrant une altération de la mémoire spatiale à long-terme dans la piscine de Morris en réponse à l'injection i.c.v du peptide A β ₂₅₋₃₅ (Maurice, Lockhart, & Privat, 1996; Sun & Alkon, 2002; Chavant *et al.*, 2010; Zussy *et al.*, 2011; 2013). L'utilisation de protocoles différents pour l'apprentissage, ainsi que des délais variables entre la fin de l'apprentissage et le test sont très probablement en cause dans la divergence observée.

III. L'influence de la supplémentation en vitamine A sur la protéolyse de l'APP chez les souris A β .

Les données de la littérature qui mettent en avant les bénéfices de l'utilisation de rétinoïdes dans un contexte de maladie d'Alzheimer rapportent l'inhibition par l'AR de la production des peptides amyloïdes et la stimulation de leur élimination (Tableau 7). L'injection du peptide A β ₂₅₋₃₅ permet d'initier le processus pathologique de transformation de l'APP et induit ainsi la production de peptides amyloïdes endogènes chez la souris (Chavant *et al.*, 2010; Meunier *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous avons souhaité évaluer la capacité de la vitamine A, préalablement administrée par voie alimentaire, à empêcher ou à limiter ce processus.

Outre une tendance à la diminution de l'expression d'ADAM10, l'expression génique des enzymes impliquées dans la production et l'élimination des peptides A β n'a pas été significativement modifiée par l'injection du peptide A β ₂₅₋₃₅. Ainsi, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, l'accumulation de peptides amyloïdes endogènes pourrait ne pas avoir été induite chez notre modèle.

Toutefois, une grande partie des travaux qui utilisent ce modèle d'injection i.c.v du peptide A β ₂₅₋₃₅ ne fait pas nécessairement une caractérisation complète des acteurs de la pathologie amyloïde. Le plus souvent, seule une analyse de l'expression protéique de l'APP par Western Blot et du fragment issu de son clivage par la β -sécrétase est réalisée et s'accompagne parfois du dosage des peptides amyloïdes par ELISA (Zussy *et al.*, 2011; Lahmy *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013; Zussy *et al.*, 2013). Ces travaux se concentrent généralement davantage sur les conséquences fonctionnelles de l'injection du peptide, comme par exemple l'altération de la plasticité synaptique (Sun & Alkon, 2002; Trubetskaya *et al.*, 2003; Isono *et al.*, 2013), de la neurogénèse hippocampique (Wang, Chen, Li, *et al.*,

2015), ou de l'activité de l'axe HPA (Zussy *et al.*, 2011; Brureau *et al.*, 2013), et leur incidence comportementale. Pineau *et al.* 2016 ont montré que l'injection i.c.v du peptide A β_{25-35} induisait une augmentation de l'expression protéique d'APP, BACE1 et une diminution d'IDE dans l'hippocampe de rats (Pineau *et al.*, 2016). Ainsi, l'absence de modification de l'expression génique des enzymes clés de la voie pro-amyloïde dans notre modèle, n'est pas suffisante pour considérer que la production des peptides endogènes n'a pas été impactée par l'A β_{25-35} . L'expression génique peut ne pas être impactée, alors que les protéines subissent des modifications de leur expression ou de leur activité. L'évaluation de l'expression protéique de BACE, ADAM10 et IDE n'a pas révélé de différence entre nos groupes (données non montrées). Ainsi, l'analyse de la production de ces peptides endogènes devra être réalisée.

IV. L'effet bénéfique de la vitamine A sur la mémoire est indépendante de la régulation de l'axe du stress.

Le modèle d'injection i.c.v de peptides A β_{25-35} est connu pour être sujet à une hyperactivité de l'axe HPA (Zussy *et al.*, 2011; Brureau *et al.*, 2013; Zussy *et al.*, 2013; Pineau *et al.*, 2016). Or, une hyperactivité de cet axe serait un facteur de risque de développer la MA et a été rapportée chez les malades (Swanwick *et al.*, 1998; Vyas & Maatouk, 2013; Canet *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018; Caruso *et al.*, 2019). Parallèlement, une action régulatrice de la voie de signalisation de l'AR sur l'activité de l'axe HPA a été décrite chez le rongeur (Marissal-Arvy *et al.*, 2013; Bonhomme, Minni, *et al.*, 2014; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Brossaud *et al.*, 2017; Bonhomme *et al.*, 2019). Ces éléments nous ont incité à vérifier si l'effet protecteur de la supplémentation en vitamine A au niveau comportemental pouvait être la conséquence de la restauration d'une activité normale de l'axe HPA en réponse à l'injection du peptide.

Contrairement aux données de la littérature, nous n'avons pas retrouvé de modification de l'activité de l'axe HPA chez les souris A β . En premier lieu, nous n'avons pas obtenu d'augmentation de la concentration circulante de corticostérone qui a été largement rapportée dans la littérature (Zussy *et al.*, 2011; Brureau *et al.*, 2013; Zussy *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Jayasingh Chellammal *et al.*, 2019). L'évaluation de l'expression génique

des MRs, des GRs, de Sgk1 et de la 11 β -Hsd1 n'a pas non plus révélé de phénotype spécifique du groupe A β chez notre modèle.

Cette absence de phénotype A β peut s'expliquer par le fait que, malgré la toxicité reconnue de ces peptides, six semaines après leur injection dans les ventricules de souris jeunes adultes, elles ont pu développer des mécanismes compensatoires leur empêchant de subir une dérégulation durable de l'axe HPA. Ainsi, une évaluation de son état d'activité plus proche de l'injection intracrânienne aurait pu être davantage informative sur la perte potentielle de régulation de son activité induite par le peptide A β ₂₅₋₃₅.

Cependant, le niveau d'anxiété des animaux n'a pas permis de distinguer les souris Scb et les souris A β , trois semaines après l'injection du peptide. Il en est de même lors de la mise au point du modèle, à une semaine et trois semaines après l'injection intracrânienne. Bien que des dérégulations moléculaires puissent se produire avant que leurs conséquences comportementales ne soient détectables, les données que nous avons obtenues convergent vers une absence de modification de l'état d'activité de l'axe HPA due au peptide. Toutefois, le temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix corrélait négativement avec l'expression de la 11 β -Hsd1 chez les souris Scb, mais pas chez les souris A β . Ceci suppose que les souris Scb seraient d'autant plus anxieuses que l'expression de cette enzyme est importante, comme suggéré par les travaux de Wheelan *et al.* 2018 qui montrent que la déficience de 11 β -Hsd1 atténue les symptômes anxieux chez la souris (Wheelan *et al.*, 2018), mais que chez les souris A β , cette association serait perdue. Néanmoins, nous ne disposons pas d'éléments permettant de confirmer cette supposition. Ainsi, c'est probablement par d'autres mécanismes que le régime enrichi en vitamine A est parvenu à préserver la mémoire de ces animaux.

V. Les mécanismes qui sous-tendent la préservation de la mémoire des souris A β par la vitamine A.

Nos résultats suggèrent que l'injection des peptides A β ₂₅₋₃₅ a perturbé la voie de signalisation de l'AR. En effet, le profil d'expression des récepteurs RARs et de l'enzyme de synthèse de l'AR, *Raldh2*, dans l'hippocampe des différents groupes indique que l'exposition au régime enrichi en vitamine A, n'induit visiblement pas les mêmes conséquences chez les souris Scb et chez les souris A β . En effet, l'augmentation de l'expression de la *Raldh2* chez les souris A β en réponse à la vitamine A, laisse supposer que la prévention des altérations de mémoire pourrait être directement liée, chez ces

animaux, à une augmentation de la production d'AR hippocampique. Ceci est cohérent avec la corrélation positive que nous mettons en évidence entre les performances des animaux dans le labyrinthe en Y et l'expression de la Raldh2. Cette corrélation suggère en effet que le niveau de performance des animaux A β est fonction de la synthèse d'AR. Chez les souris Scb cette corrélation est négative et suggère que l'augmentation de l'AR hippocampique conduit au contraire à des altérations mnésiques. Cette différence nous laisse supposer que le niveau d'activité de la voie des rétinoïdes dans le cerveau de ces deux groupes expérimentaux est à l'opposé après l'injection. Un effet bénéfique de l'AR a toujours été rapporté chez des animaux qui présentent une faible activité de la voie des rétinoïdes, (liée au vieillissement ou à la carence en vitamine A (Bonnet *et al.*, 2008; Mingaud *et al.*, 2008; Bonhomme, Minni, *et al.*, 2014; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014)). Cependant, l'AR peut se montrer délétère chez les animaux qui ont une activité normale de la voie des rétinoïdes (*i.e.* un niveau d'AR suffisant) (animaux jeunes, ou présentant un statut optimal en vitamine A) (Goodman & Pardee, 2003; McCaffery *et al.*, 2003; Crandall *et al.*, 2004; Adams, 2010; Oliveira, 2015).

Cet effet de la production d'AR sur les performances mnésiques va dans le sens de la nécessité de maintenir une régulation fine de la concentration d'AR dans le cerveau pour garantir le maintien des performances de mémoire.

Par ailleurs, la forte corrélation positive entre l'expression des récepteurs de l'AR et l'expression de Adam10 ou Ide conforte l'idée que la voie de signalisation de l'AR a un effet modérateur vis à vis de la pathologie amyloïde. Les corrélations que nous avons obtenues ont déjà été rapportées chez un modèle d'injection intra-hippocampique de peptides A β_{42} chez le rat (Zeng, Li, *et al.*, 2017) et sont dans la lignée des données déjà existantes qui montrent qu'une stimulation avec de l'AR augmente l'expression génique et protéique d'ADAM10 et d'IDE (Melino *et al.*, 1996; Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Holthoewer *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2013; Kawahara *et al.*, 2014).

De plus, ADAM 10 est la protéase clé du processus non-amyloïdogénique de clivage de l'APP. L'augmentation de son expression est donc en faveur d'une atténuation du processus de production des peptides amyloïdes (Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Agostinho *et al.*, 2015; Peron *et al.*, 2018). IDE est une protéase clé dans la dégradation des peptides amyloïdes (Nalivaeva *et al.*, 2012), l'augmentation de son expression est donc en faveur d'une moindre accumulation de ce peptide. Cependant, les effets de la vitamine

A sur l'expression génique des enzymes de la voie amyloïdogénique n'ont pas été assez saillants pour pouvoir considérer que c'est par leur intermédiaire que le régime a permis de préserver la mémoire des souris A β . Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que la signalisation de l'AR exerce une action sur l'expression d'autres molécules empêchant l'accumulation des peptides A β . En effet, l'apoE ou la néprilysine, impliquées dans la clairance des amyloïdes, sont également régulées par la signalisation de l'AR (Cramer *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Clemens *et al.*, 2018).

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude apporte des arguments en faveur d'une relation entre l'élévation de la production hippocampique d'AR, induite par un régime enrichi en vitamine A et le maintien des performances mnésiques des souris A β dans le labyrinthe en Y. Cependant, ils ne permettent pas d'élucider les mécanismes en jeu.

VI. Conclusion

Le modèle d'injection i.c.v de peptides A β_{25-35} s'est montré difficile à mettre en œuvre. En effet, les observations comportementales que nous avons faites ont souvent été en contradiction avec les données de la littérature, notamment le test de la reconnaissance d'objet, la piscine de Morris ou encore le labyrinthe en croix surélevé (Sun & Alkon, 2002; Zussy *et al.*, 2011; Brureau *et al.*, 2013; Isono *et al.*, 2013; Lahmy *et al.*, 2013; Zussy *et al.*, 2013). De plus, au niveau moléculaire, nos résultats n'ont pas permis de fournir d'éléments qui prouvent de façon indiscutable que l'injection de ces peptides a effectivement initié le processus pathologique de la production d'espèces amyloïdes.

Malgré cela, les données que nous avons obtenues forment un faisceau d'arguments en faveur d'une perturbation de la voie de signalisation hippocampique de l'AR par l'injection de peptides A β_{25-35} et d'un effet préventif d'un apport nutritionnel vitamine A sur ces processus. En particulier, nos résultats laissent supposer que l'administration de vitamine A par voie alimentaire a pu induire une élévation du niveau hippocampique d'AR. Ceci avait déjà été observé chez des animaux âgés (Dumetz *et al.*, 2019). Or, cet effet semble n'intervenir que chez les souris A β -injectées, ce qui va dans le sens d'une spécificité de l'action bénéfique du régime enrichi en vitamine A chez les souris A β .

E. Figures

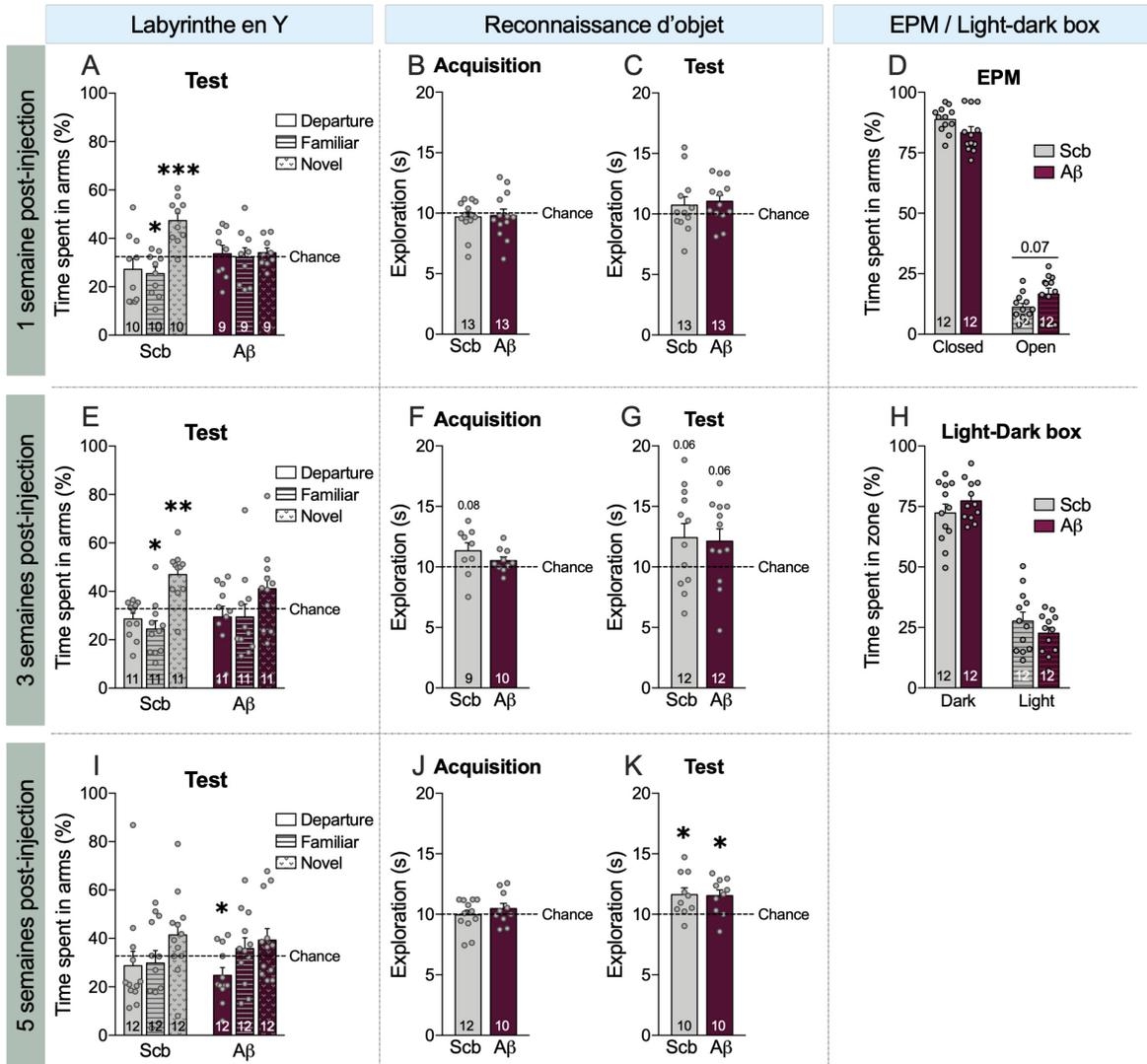


Figure 19 – Caractérisation comportementale du modèle d'injection i.c.v. de peptides Aβ₂₅₋₃₅.

Les données sont exprimées selon la moyenne +/- l'écart standard à la moyenne.

(A-D): Une semaine après l'injection du peptide. (A) : Temps d'exploration relative des bras de départ, familier et nouveau du labyrinthe en Y, pendant la phase de test. (B) : Exploration de l'objet droit pendant la phase d'acquisition du test de la reconnaissance d'objet. (C) : Exploration de l'objet nouveau pendant la phase de test de la reconnaissance d'objet. (D) : Temps relatif passé dans les bras fermés et ouverts du labyrinthe en croix surélevé. T-test non apparié : Scb vs. Aβ, $p=0.07$. (E-H) : Trois semaines après l'injection du peptide. (E) : Temps relatif d'exploration des bras de départ, familier et nouveau du labyrinthe en Y, pendant la phase de test. (F) : Exploration de l'objet droit pendant la phase d'acquisition du test de la reconnaissance d'objet. (G) : Exploration de l'objet nouveau pendant la phase de test de la reconnaissance d'objet. (H) : Temps relatif passé dans les compartiments sombre et éclairé de la boîte. (I-K) : Cinq semaines après l'injection du peptide. (I) : Temps relatif d'exploration des bras de départ, familier et nouveau du labyrinthe en Y, pendant la phase de test. (J) : Exploration de l'objet droit pendant la phase d'acquisition du test de la reconnaissance d'objet. (K) Exploration de l'objet nouveau pendant la phase de test de la reconnaissance d'objet.

Statistiques : One-sample T-test de comparaison à la valeur théorique du hasard : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

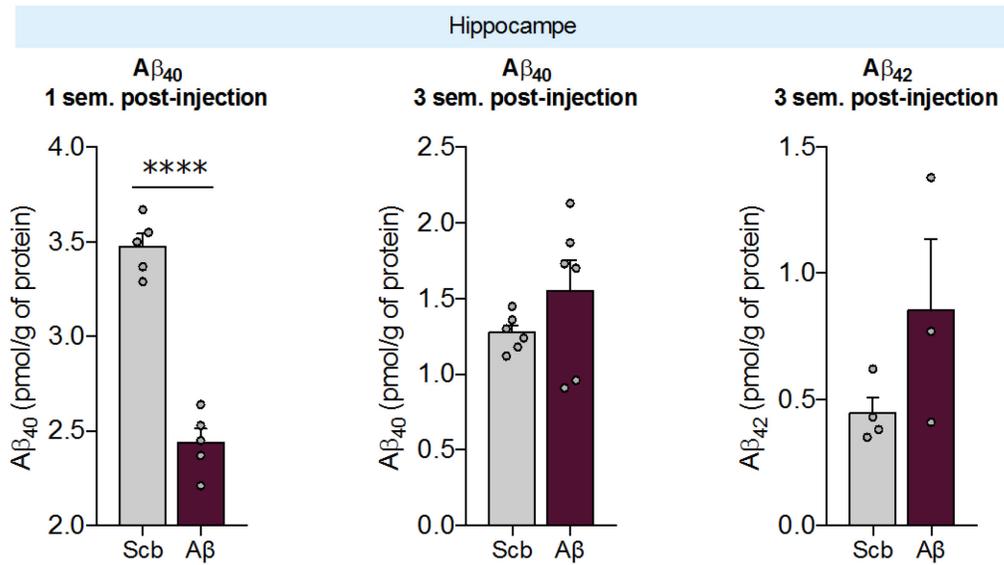


Figure 20 – Quantité de peptides amyloïdes murins endogènes totaux produits suite à l’injection i.c.v de peptides Aβ₂₅₋₃₅.

(A) : Quantité de peptides Aβ₄₀ produits retrouvée dans l’hippocampe une semaine post-injection. (B) : Quantité de peptides Aβ₄₀ produits retrouvée dans l’hippocampe trois semaines post-injection. (C) : Quantité de peptides Aβ₄₂ produits retrouvée dans l’hippocampe trois semaines post-injection. Statistiques : T-test non-apparié : Scb vs. Aβ, ****p<0.0001

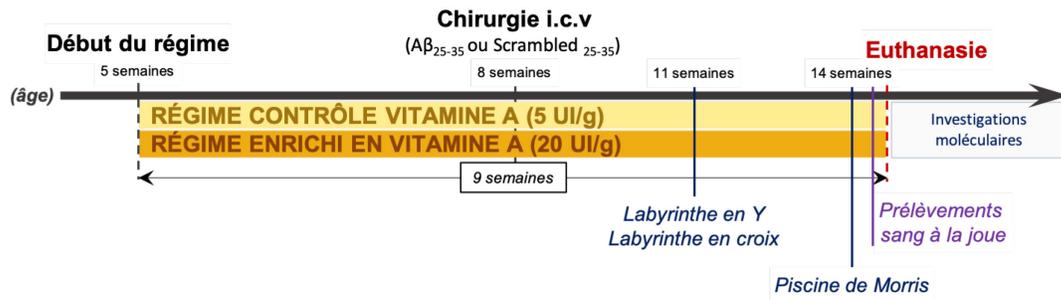


Figure 21 – Déroulement du protocole expérimental utilisé pour l'évaluation des effets bénéfiques d'un régime enrichi en vitamine A sur les altérations induites par l'injection i.c.v de peptides $A\beta_{25-35}$.

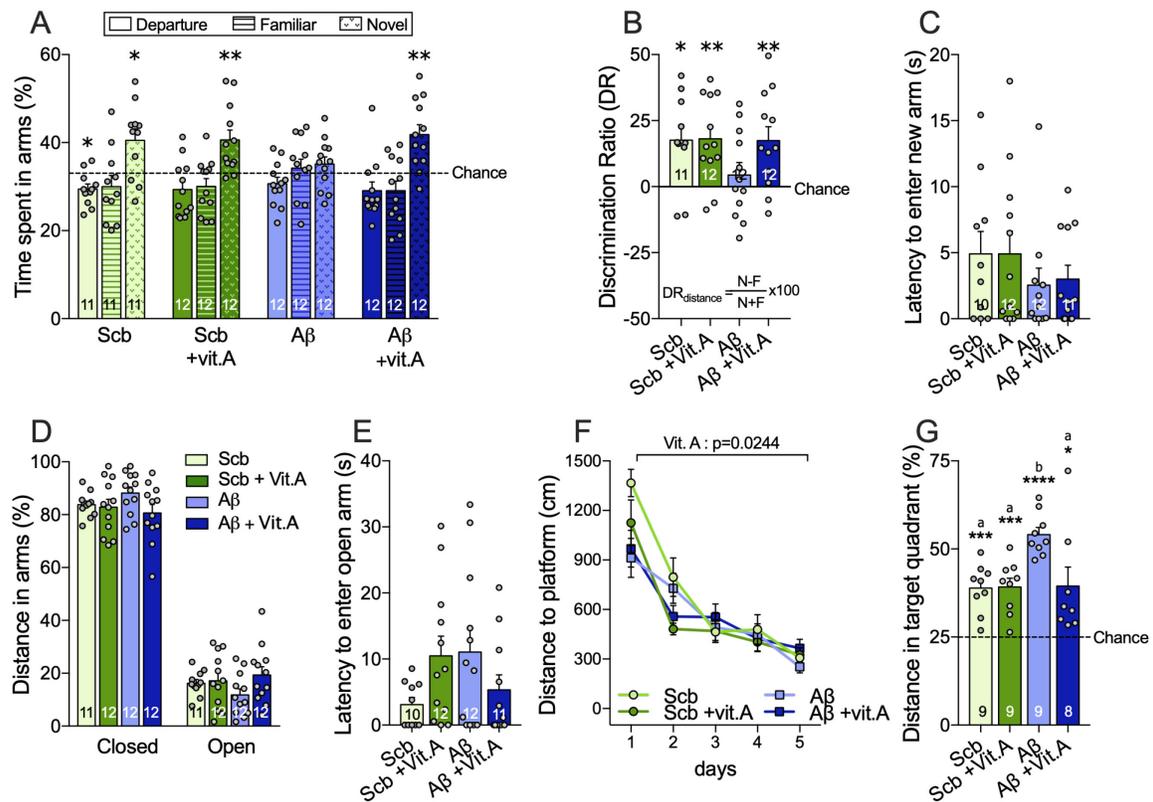


Figure 22 – Étude des effets d’un régime enrichi en vitamine A sur le comportement des souris injectées avec le peptide Aβ₂₅₋₃₅.

(A) : Temps relatif passé chaque bras du labyrinthe en Y pendant la phase de test. (B) : Ratio de discrimination de l’exploration des bras nouveau et familier sur la base de la distance parcourue. (C) : Latence à entrer dans le bras nouveau du labyrinthe en Y pendant la phase de test. (D) : Distance relative parcourue dans les bras ouverts et les bras fermés du labyrinthe en croix surélevé. (E) : Latence à entrer dans un bras ouvert du labyrinthe en croix surélevé. (F) : Courbes d’apprentissage de la localisation de la plateforme dans la piscine de Morris. (G) : Distance parcourue dans le quadrant cible au cours de la phase de test de la piscine de Morris, 72 heures après le dernier jour d’apprentissage. Les groupes associés à la même lettre ne sont pas différents statistiquement.

Statistiques : One-sample t-test de comparaison à la valeur théorique du hasard : *p < 0.05, **p < 0.01 (A, B, G). ANOVA-2-facteurs : pas d’effet du peptide, ni de la supplémentation, p = NS (B, D). ANOVA-2-facteurs en Mesures Répétées : interaction régime x jour d’apprentissage : p = 0.0244 (F). Test de Kruskal-Wallis (p = NS) (C, E) ; (p < 0.01), suivi d’une analyse post-hoc de Dunn : a vs. b, p < 0.05 (G).

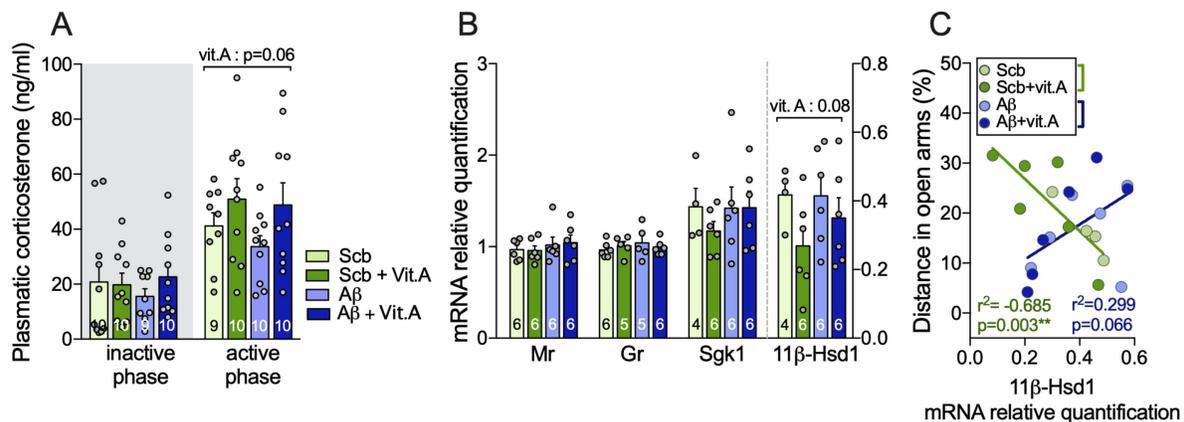


Figure 23 – Caractérisation de l'état d'activité de l'axe HPA en réponse à l'injection i.c.v du peptide A β_{25-35} et à l'exposition au régime enrichi en vitamine A.

(A) : Concentration plasmatique de corticostérone prélevée en conditions basales au début de la phase inactive (8h) et de la phase active (19h). (B) : Expression hippocampique des gènes codant pour les MRs, les GRs, la Sgk et la 11 β -HSD1. La ligne en pointillés sépare les gènes dont l'expression a été rapportée sur l'axe des ordonnées de gauche ou de droite. Corrélation entre la distance parcourue dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé et l'expression hippocampique de la 11 β -HSD1 chez les souris injectées avec le peptide A $\beta_{Scrambled}$ (Scb) ou A β_{25-35} (A β), indépendamment du régime reçu. Abréviations : MRs, Récepteurs des Minéralocorticoïdes ; GRs, récepteurs des Glucocorticoïdes ; Sgk1, Serum and Glucocorticoid regulated Kinase 1 ; 11 β -HSDI, 11 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase de type I.

Statistiques : ANOVA-2-facteurs : tendance à l'effet du régime (A,B). Régression linéaire (C).

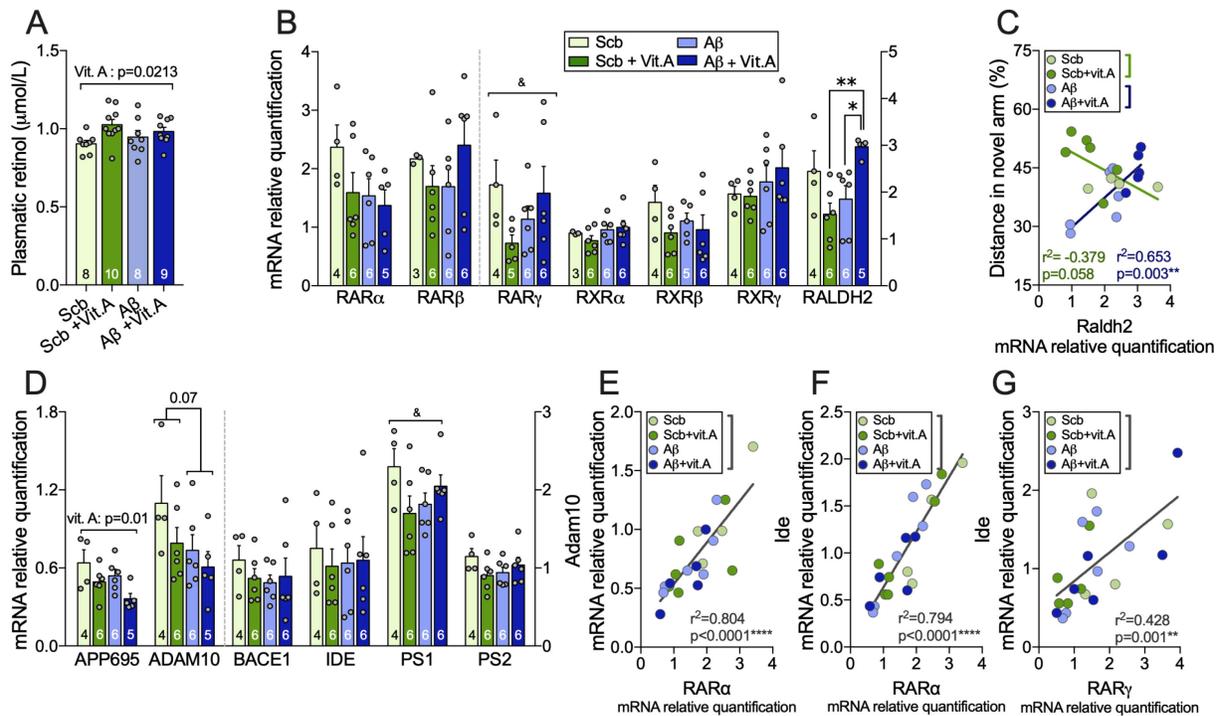


Figure 24 – Évaluation de l'expression des récepteurs de l'AR et des gènes impliqués dans l'accumulation de peptides Aβ.

(A) : Concentration plasmatique de rétinol. (B) : Expression hippocampique des gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'AR : les récepteurs de l'AR ; RAR α , RAR β , RAR γ , RXR α , RXR β , RXR γ , et l'enzyme de synthèse de l'AR, la RALDH2. La ligne en pointillés sépare les gènes dont l'expression a été rapportée sur l'axe des ordonnées de gauche ou de droite. (C) : Corrélation entre la distance parcourue dans le bras nouveau du labyrinthe en Y et l'expression hippocampique de la RALDH2 chez les souris injectées avec le peptide A β _{Scrambled} (Scb) ou A β ₂₅₋₃₅ (A β), indépendamment du régime reçu. (D) : Expression hippocampique des gènes impliqués dans la production et l'accumulation des peptides A β : l'APP695, ADAM10, BACE1, IDE, PS1, PS2. La ligne en pointillés sépare les gènes dont l'expression a été rapportée sur l'axe des ordonnées de gauche ou de droite. (E-G) : Corrélation entre l'expression génique d'ADAM10 et de RAR α (E), d'IDE et de RAR α (F) et d'IDE et de RAR γ dans l'hippocampe de tous les groupes expérimentaux confondus.

Abbréviations : RAR, Retinoic Acid Receptor ; RXR, Retinoid X Receptor ; RALDH2, Retinaldéhyde Déshydrogénase de type 2 ; APP, Amyloid Précursor Protein ; ADAM10, A Disintegrin And Metalloprotease 10 ; BACE1, Beta Amyloid Cleaving Enzyme 1 ; IDE, Insulin Degrading Enzyme ; PS1, PS2, Présénilin 1 et 2. Statistiques : ANOVA-2-facteurs : effet du régime (A, D) ; effet du peptide (D) : p=0.07 ; interaction régime x peptide, & p=0.053 pour RAR γ (B), & p=0.002 pour RALDH2 (B), & P=0.041 pour PS1 (D). Analyse post-hoc avec le test de Dunn pour RALDH2 (B) : *p<0.05 ; **p<0.01. Régression linéaire (C, E, F, G).

Linear Regression (Pearson's correlation)	ADAM10	IDE
RAR α	R ² =0.804 p<0.0001	R ² =0.794 p<0.0001
RAR β	R ² =0.155 p=0.085	R ² =0.364 p=0.004
RAR γ	R ² =0.234 p=0.031	R ² =0.428 p=0.001
RXR α	R ² =0.203 p=0.046	R ² =0.423 p=0.001
RXR β	R ² =0.123 p=0.13	R ² =0.006 p=0.74
RXR γ	R ² =0.001 p=0.92	R ² =0.155 p=0.070
RALDH2	R ² =0.002 p=0.83	R ² =0.001 p=0.87

**** *p-value* N.S.



Tableau 9 – Récapitulatif des corrélations linéaires entre l'expression hippocampique des récepteurs des rétinoïdes et l'expression d'ADAM10 et d'IDE de tous les groupes expérimentaux confondus.



A β ₂₅₋₃₅

SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS CHEZ LE MODÈLE A β

1. Le régime enrichi en vitamine A préserve la mémoire spatiale à court-terme des souris A β .
2. Le régime enrichi en vitamine A a induit une augmentation de l'expression de la Raldh2, laquelle corrèle positivement avec les performances de mémoire des souris A β . Ceci suggère que la préservation de la mémoire par le régime impliquerait une augmentation de la production hippocampique d'AR.
3. Le régime enrichi en vitamine A n'a pas eu d'effet sur l'expression hippocampique des enzymes de synthèse des peptides A β . Cependant, l'expression des récepteurs de l'AR est associée à plus de production des enzymes protectrices vis-à-vis de ces peptides, ADAM10 et IDE.

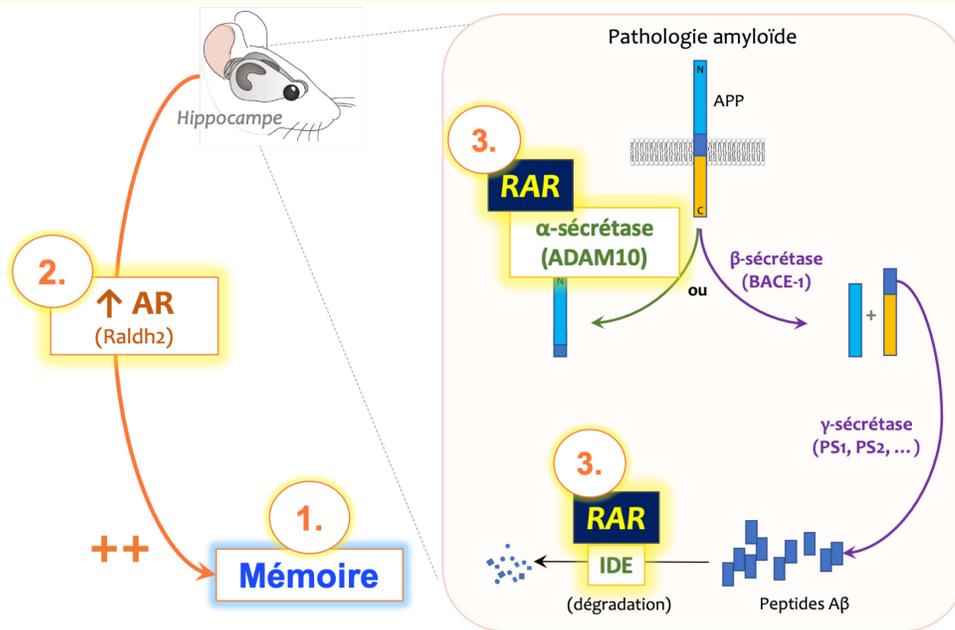


Figure 25 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le modèle de souris A β .

Chapitre 2 :

ÉTUDE DES EFFETS PRÉVENTIFS D'UN RÉGIME ENRICHİ EN VITAMINE A SUR LES PERFORMANCES MNÉSİQUES ET L'ÉVOLUTION DE LA NEUROPATHOLOGIE ALZHEIMER CHEZ LE MODÈLE DE SOURIS 3xTg-AD.

Résumé

La vitamine A (VA), par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque (AR), son métabolite actif, soutient de nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme telles que le maintien de la fonction cognitive au cours de la vie. Bien que son implication dans la maladie d'Alzheimer (MA) ait été peu étudiée, des données suggèrent qu'une altération de la signalisation cérébrale de l'AR est associée à l'accumulation de peptides amyloïdes- β ($A\beta$). Dans cette étude, nous avons évalué la capacité d'un régime enrichi en VA (20 UI/g) d'une durée de six mois à prévenir la neuropathologie de type Alzheimer chez le modèle de souris 3xTg-AD. Le régime enrichi en VA a préservé les performances de mémoire des souris 3xTg-AD âgées de 14 mois dans le labyrinthe en Y. La supplémentation en VA a eu un effet opposé sur la signalisation hippocampique de l'AR des mâles et des femelles, témoigné par une augmentation et une diminution de l'expression génique des récepteurs de l'AR chez les mâles et les femelles respectivement. Le régime enrichi en VA a également réduit l'accumulation hippocampique de peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ ainsi que la phosphorylation de la protéine tau sur l'épitope PHF1 chez les mâles. En revanche, le régime n'a pas eu d'effet sur la phosphorylation de tau des femelles et a même induit une élévation de la quantité hippocampique de peptides $A\beta$. L'expression hippocampique de RXR β était négativement corrélée avec la quantité de peptides $A\beta$ solubles et insolubles dans l'hippocampe chez les deux sexes. Ensemble, nos résultats suggèrent qu'une exposition chronique au régime enrichi en VA pourrait exercer des effets bénéfiques sur la neuropathologie Alzheimer plus particulièrement chez les mâles.

Abstract

Vitamin A (VA), via its active metabolite retinoic acid (RA), has multiple important physiological roles including maintenance of cognitive function with advancing age. Although its role in Alzheimer's disease (AD) has been the subject of limited investigations, data suggest that impaired brain VA signaling is associated with accumulation of β -amyloid peptides ($A\beta$). In the present study, we evaluated the preventive action of a 6-month dietary VA supplementation (20 IU/g) in the 3xTg-AD mouse model of AD neuropathology. High VA diet preserved memory performance in the Y maze of 14-month-old 3xTg-AD mice. VA supplementation affected hippocampal RA signaling in an opposite way in males and females, showed by an increased and decreased mRNA expression of RA receptors in each sex respectively. VA-enriched diet also reduced the amount of hippocampal $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ and the phosphorylation of tau protein at the PHF1 epitope in males. The VA-enriched diet had no effect on tau phosphorylation in females, and even worsened their hippocampal amyloid load. The expression of RXR β in the hippocampus was negatively correlated with the amount of both soluble and insoluble $A\beta$ in males and females. Together, our data suggest that chronic exposure to a VA-enriched diet may exert beneficial effects in AD, particularly in males.

Male-specific preventive effect of dietary vitamin A supplementation in the 3xTg-AD model of Alzheimer's disease neuropathology.

Biyong E.F.^{1-3,5}, Tremblay C.³, Leclerc M.^{2,3}, Caron V.^{2,3}, Alfos S.¹, Helbling J.C.¹, Émond V.³, Pallet V.^{1,5*} & Calon F^{2-5*}.

¹ Nutrition et Neurobiologie intégrée (NutriNeuro), INRA, UMR 1286, Université de Bordeaux, France.

² Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec, Québec, Canada

³ Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval (CHUL), Axe Neurosciences, Québec, Québec, Canada

⁴ Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), Québec, Québec, Canada.

⁵ OptiNutriBrain – Laboratoire International Associé (NutriNeuro France-INAF Canada).

*These authors share senior authorship.

Keywords: Alzheimer's disease, vitamin A, aging, prevention, diet, amyloid

Corresponding author: Frederic.Calon@pha.ulaval.ca

A. Introduction

Among the 47 million people affected by dementia in the world (Winblad et al., 2016), 27 million have been diagnosed with Alzheimer's disease (AD) (Silva *et al.*, 2019), and this number is estimated to triple by 2030 (Winblad et al., 2016) constituting a social and economic burden. AD involves numerous cognitive alterations ranging from memory loss to language and executive function impairments (Skaper, 2012; Scheltens *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). The final AD diagnosis is made *post mortem* (Ballard et al., 2011), with the observation of two characteristic histopathological hallmarks in the brain; namely the presence of (i) insoluble β -amyloid peptides (A β) in the extracellular compartment, referred to as amyloid pathology, and (ii) neurofibrillary tangles, consecutive to excessive and abnormal phosphorylation of tau protein inside the neurons, thus referred to as tau pathology (Montine *et al.*, 2012; Tremblay *et al.*, 2017).

The risk of developing AD strongly increases with aging, concurrently with the decrease of vitamin A (VA) signaling, a fundamental vitamin for the adult brain function (Mey & McCaffery, 2004; Lane & Bailey, 2005; Ransom *et al.*, 2014; Stoney & McCaffery, 2016). VA (*all-trans*-retinol) is exclusively obtained in food and its circulating concentration is permanently maintained around 2 μ M (Harrison, 2012; Li et al., 2014). When needed by target organs, such as the brain, retinol is taken up from the circulation by target cells and is metabolized into retinoic acid (RA), its active metabolite. RA binds to ligand-inducible receptors in the nucleus, such as Retinoic Acid Receptors (RARs) and Retinoid X Receptors (RXRs) belonging to the nuclear receptor superfamily (Lane & Bailey, 2005; Blomhoff & Blomhoff, 2006; Ransom *et al.*, 2014), triggering the transcription of genes involved in cognition, especially learning and memory processes (Lane & Bailey, 2005; Olson & Mello, 2010; Shearer *et al.*, 2012). In the elderly, a reduced serum retinol concentration has been described (Succari, Garric, Ponteziere, Miocque, & Cals, 1991a; Leotsinidis *et al.*, 2000) and associated with cognitive decline assessed with several cognitive tests, including MMSE (Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018).

Lower expression of RAR α and RXR β in blood peripheral mononuclear cells was also reported in old (65 years old) versus young (25 years old) individuals (Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Brtko *et al.*, 2007). Likewise, a decrease in serum retinol and brain RARs and RXRs expression is observed in aging rodents and associated to memory alterations (Enderlin, Alfos, *et al.*, 1997; Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuere, 2001b; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013). In preclinical

intervention studies, the administration of pharmacological RA to aged mice enhanced their synaptic plasticity and improved their relational memory, but not when RA was co-administered with CD3106, a RAR-antagonist (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b). Similarly, VA-enriched diet improved hippocampal neurogenesis and spatial memory performances of middle-aged Wistar rats, in the Morris Water maze (Touyarot et al., 2013). Along the same lines, other studies have enlightened the beneficial effect of RA administration or VA-enriched diet on the cognitive performances of aging rodents (Feart, Pallet, et al., 2005; Mingaud et al., 2008; Bonhomme, Pallet, et al., 2014).

There is growing literature strengthening the idea that retinoids could be a therapeutic option in Alzheimer's disease (AD) (Goodman, 2006; Lee et al., 2009; Lerner et al., 2012; Ono & Yamada, 2012) as the stimulation of retinoid signaling regulates multiple targets involved in Alzheimer neuropathology, such as A β -producing enzymes (Ding et al., 2008; Koryakina et al., 2009; Tippmann et al., 2009). Furthermore, lower levels of serum retinol have been reported in AD patients compared to age-matched controls (Bourdel-Marchasson et al., 2001; Rinaldi et al., 2003; Lopes da Silva et al., 2014), along with decreased expression of RARs and RALDH, the RA-synthesis enzyme, in the brain of AD patients (Corcoran et al., 2004). Finally, VA deficiency induces A β accumulation *in vivo* (Corcoran et al., 2004), and on the contrary, the presence of A β peptides shuts down RA synthesis *in vitro* (Goncalves et al., 2013), suggesting a vicious circle between a reduced retinoid signaling activity and the onset of amyloid pathology in the brain.

We therefore hypothesized that maintaining appropriate retinoid signaling in the brain during aging could be achieved by increasing the dietary intake of VA in an animal model of AD neuropathology. In the present work, we evaluated the preventive effect of a VA-enriched diet on memory abilities and neuropathology of the 3xTg-AD mouse model of AD, which progressively develop both hallmarks characteristic of AD; amyloid- and tau-pathologies.

B. Material and Methods

All experiments performed on the animals were approved by the Canadian Council of Animal Care and Laval University ethical committee of animal protection.

I. Animals and diets

Male and female 3xTg-AD (Tg) mice were used (APP_{swe}, PS1_{M146V}, Tau_{P301L}) to model AD neuropathology and were compared to nontransgenic (NTg) mice on the same genetic background (C57BL6/129SvJ), all of which were produced concomitantly in our animal facility. They were housed in collective cages of 1 to 5 animals in a 12h/12h light/dark cycle and had *ad libitum* access to food and water. They were split into experimental groups differing by the diet they received; either a control diet providing a basal VA supply of 5 IU/g incorporated into the pellets or a vitamin-A-enriched diet containing 20 IU/g of VA (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France). Both diets are isocaloric and are distinguishable only on the basis of the amount of VA they contain. They provide 3.3 kcal/g (14% lipids from soy and groundnut oils and 60% carbohydrates, mostly from starch). The composition of the diet is detailed in Table 10. Dietary exposure started when animals were 8-month-old, before the occurrence of massive AD neuropathology and associated cognitive alterations. Animals received either diet for 6 months, until 14 months of age. Animals and diets were weighted every two weeks. The four experimental groups are referred to as NTg, NTg+vitA, Tg, Tg+vitA.

II. Behavioral assessment

Ymaze. The protocol is based on a the two-trial spatial recognition task proposed by Delli *et al.* 2000 (Delli *et al.*, 2000). In the first trial (acquisition), animals were placed in a departure arm of the apparatus, randomly assigned for each mouse, and allowed for a free exploration of only two arms of the maze for 5 minutes. Immediately after, they were returned to their home cages for an hour. For the second trial (test), they were replaced in the same departure arm and allowed to freely explore the whole maze for 5 minutes. Light intensity in the center of the maze was 25 lux. Animals that spent more than 90% of the time in the departure arm during the acquisition or the test phase were excluded from the statistical analysis. This criterion led to the exclusion of 14 animals (8 females of which 5 are of the 3xTg-AD genotype and 6 males, of which 3 are of the 3xTg-AD genotype, regardless of the

diet they received. The discrimination ratio (DR) was calculated as follows: $DR = (\text{distance travelled (cm) in: novel arm} - \text{familiar arm}) / (\text{distance travelled in: novel arm} + \text{familiar arm}) \times 100$.

Light-dark box. To assess anxiety-like behavior, animals were placed in the dark compartment of the box and had 5 minutes to dare enter and explore the anxiogenic light compartment (235 lux in the center). Each compartment measured 20 x 20 x 20 cm (Arsenault *et al.*, 2013; St-Amour *et al.*, 2014).

Open Field. Locomotor activity of mice was assessed individually in a 40 x 40 cm plexiglass box and recorded by an automated recording of photobeam breaks over a period of 30 min.

III. Tissue collection and protein extraction

Animals received a dose of ketamin-xylazin mix (100 mg/kg of ketamin and 10 mg/kg of xylazin) and were maintained on a heating pad to maintain body temperature, until they were deeply anesthetized. Then, blood was collected intracardially, and animals were perfused with 50 ml of cold PBS containing protease and phosphatase inhibitors, delivered at a rate of 8ml/min. Hippocampi were collected and snap-frozen on dry ice.

For protein extraction, hippocampi were homogenized in Tris-buffered saline (TBS) and sequentially centrifuged in order to allow a separation between a TBS-soluble cytosolic fraction, a detergent-soluble membrane fraction and an detergent-insoluble fraction (formic acid extracts) as described (St-Amour *et al.*, 2014; Tournissac *et al.*, 2019). After the first centrifugation, supernatant being the TBS-soluble protein fraction was collected and stored at -80°C. The remaining pellet was dissolved in a lysis buffer containing detergents, (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaH₂PO₄, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100) with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged (100,000 g, 20 min, 4°C). The supernatants corresponding to the detergent-soluble membrane protein fraction were collected and stored at -80°C. The remaining pellet was solubilized in formic acid (99%) and centrifuged (100,000 g, 20 min, 4°C). The supernatants corresponding to the detergent-insoluble protein fraction was evaporated at room temperature for three days. The dry residue was resuspended in guanidine 50 mM (Vandal *et al.*, 2015).

After protein extraction, the quantification of protein content in each sample was determined for the cytosolic soluble and membrane protein fractions only, by using a BCA Protein Kit Assay (Pierce™, ThermoFisher Scientific, USA).

IV. A β ₄₀ and A β ₄₂ quantification

The amount of both human A β ₄₀ and A β ₄₂ was determined in the TBS-soluble and detergent-insoluble (formic acid extracts) fractions generated from the hippocampus of 3xTg-AD mice using an ELISA kit (Wako, Osaka, Japon), according to the manufacturer's instructions. Insoluble amount of amyloid was related to the weight of hippocampus before homogenization. Absorbance was read at 450 nm.

V. Western Immunoblotting

Western Blot analysis was performed on mouse hippocampal cytosolic and membrane protein fractions. The protocol used is described elsewhere (Vandal et al., 2014). Briefly, 20 μ g of proteins of each sample were loaded on an acrylamide gel (10%) and separated by SDS-PAGE Electrophoresis. Then, samples were transferred on a PDVF membrane, that was blocked with a solution of milk (milk 5%, BSA 0.5%) for one hour. The membrane was then incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by an incubation with secondary antibodies. The luminescence produced by the addition of chemiluminescent reagents on the membrane was recorded with ChemiDoc system (Biorad). The quantification was performed with ImageLab software (Biorad). All samples were placed on the same gel. The antibodies used are provided in Table 11.

VI. Real-time PCR (RT-PCR)

Total hippocampal RNAs were extracted using TRIzol Reagent™ (Invitrogen, Saint Aubin, France). RNA integrity, concentration and purity were obtained by the use of both RNA 6000 Nano LabChip kit for Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop™ technologies, Fisher Scientific) and 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Then, 1 μ g of RNA was reverse transcribed into cDNAs using oligodT, random primers and ImProm II reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions. The real-time PCR was operated with the LightCycler 480 system (Roche Diagnostics) and both GAPDH and actin served as housekeeping genes as their expression was equivalent in all experimental groups. mRNA relative quantification was obtained with the GenEx™ MultiD software (Göteborg, Sweden), using the comparative threshold method described elsewhere (Pfaffl, 2001).

VII. Plasmatic Retinol

Plasma samples containing retinol were solubilized in hexane added with butylated hydroxytoluene (BHT) as an antioxidant, after the addition of internal standard solution (α -tocopherol). Following thorough vortex, samples were centrifuged for 2 min at 12000 rpm at room temperature. Then, samples were submitted to azote evaporation and dry residue containing retinol was resuspended in methanol. The amount of retinol was measured by HPLC (UV detection) (Marissal-Arvy *et al.*, 2013).

VIII. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$. To compare groups to each other, equality of variances between groups was assessed for each measurement using Bartlett's test. When variances were equal, three-way-ANOVA was performed to assess the effects of the following independent factors: genotype, VA supplementation and sex. When the effect of sex was significant, the analysis of genotype and VA supplementation effects was performed separately in males and females, using two-way ANOVA. A Tukey's post-hoc test was done to compare groups when appropriate. In the case of inequality of variances, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare groups, and upon significance, followed by a Dunn's post-hoc test. The comparison of only 2 groups was done using unpaired T-tests when variances were equal, otherwise a non-parametric Mann-Whitney test was performed. Two-tailed T-tests were used to compare a group's mean with a theoretical value (Y-maze). The correlation between observations was obtained using linear regression to determine coefficients of determination. All statistical analyses were performed on Prism 7 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) or JMP (version 14.0.0; SAS Institute Inc., Cary, IL, USA).

C. Results

I. Vitamin A supplementation preserved memory performances of 3xTg-AD mice.

The protocol used to assess hippocampal-dependent spatial recognition memory in the Y-maze (Dellu *et al.*, 2000) is provided in Fig. 26A. Exploration of the maze during acquisition phase was equivalent between groups, except for NTg+vitA animals whose travelled distance was longer (Fig. 26B). During the test phase, with a DR not differing from zero, the Tg group was unable to discriminate between the novel and the familiar arms (Fig. 26C). However, the administration of a vitamin-A-enriched diet (Tg+vitA) allowed these animals to recognize the novel arm similarly to NTg group. VA supplementation in NTg group (NTg+vitA) impaired their ability to perform in the test (Fig. 26C). Animals which did not reach the criterion to be included in the analyses were removed, among which most were females. Thus, the beneficial effect of dietary VA could not be analyzed in a sex-dependent manner. The latency to enter the new arm of the Y-maze during the test phase (Fig. 26D) and the total locomotor activity in the open field over a 30-min period (Fig. 26E) of all groups were equivalent. The travelled distanced in the open field in the six consecutive segments of five minutes showed that NTg+vitA group was slightly more mobile than other groups (Fig. 26F). Concerning the anxiety-like behavior, there was not statistical difference between groups when sexes were pooled (Fig. 26G), however the sex effect was significant ($p < 0.01$) and mostly attributable to the fact that males globally ventured themselves more in the light compartment than females (Fig. 26H). While all female groups spent the same amount of time in the light part of the box, male NTg+vitA and Tg groups spent more time than NTg mice in the light compartment. Finally, the latency to exit the dark zone after being introduced in the box is equivalent between groups (Fig. 26I).

Overall, VA supplementation prevented hippocampal-dependent spatial recognition memory alterations of Tg mice evaluated in the Y-maze.

II. VA status and signaling

VA status and expression of VA receptors were analyzed separately in both sexes due to a significant sex effect ($p < 0.01$) on plasmatic concentrations of retinol. Female 3xTg-AD mice had lower levels of retinol in the plasma when compared to their NTg counterparts, a

difference not observed in male 3xTg-AD mice (Fig. 27A). VA supplementation did not alter plasma retinol in females, whereas it induced an increase in plasma retinol in male NTg, but not in male 3xTg-AD (Fig. 27A). This suggest a complex relationship between plasma retinol, sex and transgenes.

We next sought to evaluate the mRNA expression of retinoid receptors in the hippocampus of VA-treated 3xTg-AD mice. We observed that VA supplementation decreased the expression of RXR α in female transgenic mice (Tg+vitA) but rather tended to increase its expression in males (Fig. 27B). Similar trends were seen for RXR β and RXR γ without reaching statistical significance (Fig. 27C and 27D). No change was observed either in mRNA transcript of RALDH the enzyme of retinoic acid synthesis (Fig. 27E).

Together, these results suggest opposite response to VA supplementation on the expression of VA receptor in the hippocampus of female versus male 3xTg-AD mice.

III. VA-enriched diet reduced A β and tau-pathologies in 3xTg-AD males but not in females.

Levels of soluble and insoluble transgenetically-induced human A β ₄₀ and A β ₄₂ were higher in the hippocampus of females (Fig. 28A, 28C), but lower in males (Fig. 28B, 28D), following VA treatment. A β concentrations were up to ten-fold higher in females than the one of males, consistent with other studies (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Bories *et al.*, 2012; Vandal *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). This higher level of A β in females was associated with an increase of Amyloid Precursor Protein (APP) following VA supplementation (Fig. 28E), whereas no such association was observed in males (Fig. 28E). Hippocampus content in ADAM10, the enzyme involved in non-amyloidogenic processing of APP, BACE, the enzyme promoting the production of A β from APP, or IDE, an enzyme capable of degrading A β peptides, was not affected by vitamin-A-enrichment in females or males (Fig. 28F, 28G, 28H).

Extensive accumulation of the protein tau, particularly in its hyperphosphorylated form, is closely linked to AD symptoms (Tremblay *et al.*, 2017). The total amount of tau was equivalent in both males and females, with no impact of VA-enriched diet (Fig. 28I), however, the diet decreased significantly the phosphorylation of Ser₃₉₆ and Ser₄₀₄ specifically in males (Fig. 28J). This reduced phosphorylation of Tau was associated with decreased levels of CDK5, a kinase involved in tau phosphorylation, including PHF1 epitope (Cuadrado-Tejedor *et al.*, 2011).

Overall, VA supplementation alleviated both amyloid- and tau-pathologies of male 3xTg-AD mice, but not in females.

IV. Higher retinoid signaling is associated with reduced to β -amyloid peptide production in 3xTg-AD mice, regardless of VA supplementation.

Hippocampal expression of RXR β was negatively correlated to hippocampal soluble A β ₄₀ in both male and female transgenic mice (Fig. 29A), and also with soluble A β ₄₂ (Fig. 29B), when Tg and Tg+vitA groups are pooled. Moreover, higher expression of hippocampal RXR β also is associated to a lesser accumulation of soluble A β ₄₂ (Fig. 29C), as well as insoluble A β ₄₀ (Fig. 29D) in the hippocampus of males only. Together, these results support the idea that lower retinoid signaling is associated with the extent of amyloid-pathology.

D. Discussion

The aim of the present study was to evaluate whether a chronic preventive VA-enriched diet could alleviate the development of AD-type neuropathology, and consequently behavior impairment, in the 3xTg-AD mouse model. We observed that six months of VA enriched diet (20 IU/g) preserved the spatial recognition memory of 14-month-old 3xTg-AD mice in the Y maze. This protective effect on cognition was accompanied by a decrease in both A β and tau pathologies in males. In females, VA instead exerted an aggravating effect on the amount of A β peptides, but had a neutral effect on tau. The data suggest that VA supplementation may affect hippocampal RA signaling in an opposite way in males compared to females. Still, the hippocampal expression of RXR β negatively correlated with A β peptides found in the hippocampus of both sexes. The figure 30 summarizes the effects of vitamin A supplementation in 3xTg-AD mice.

I. VA supplementation preserves hippocampus-dependent memory of 3xTg-AD mice.

Considering that hippocampus-dependent episodic and spatial memories are affected in early stages of AD (Moodley *et al.*, 2015; Tromp *et al.*, 2015; Zanco *et al.*, 2018) and that

the two-trial recognition task in the Y-maze is admitted to assess spatial memory in rodents (Dellu *et al.*, 2000; Wahl *et al.*, 2017), we used this paradigm to evaluate the spatial memory abilities in our model. A six-month-long dietary VA supplementation succeeded to avoid spatial recognition memory impairment in the triple-transgenic mice. Indeed, as a positive discrimination ratio (DR) accounts for a higher exploration of the novel arm of the Y maze, the DR of 14-month-old 3xTg-AD mice was not different from zero, while it was restored to the level of NTg group when they received the preventive VA-enriched diet. Genotype or VA supplementation did not affect locomotor activity or anxiety-like behavior. These results suggest that the VA consumed during the aging of the transgenic mouse prevented or limited the development of alterations in the hippocampus and led to an enhancement of their performance in the task.

Although it has been highlighted in other murine models of AD (Ding *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2013; Behairi *et al.*, 2016), as far as we know, only one study revealed the beneficial effect of chronic retinoic acid (RA) treatment (the active form of VA), on spatial memory of the 3xTg-AD mice (Lerner *et al.*, 2012). Still, our results are in line with the literature supporting the advantageous repercussions of RA signaling stimulation on age-related hippocampal memory deficits, with either dietary or pharmacological VA administration (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b; Mingaud *et al.*, 2008; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014; Dumetz *et al.*, 2019). However, excessive VA provision (*i.e.* in the absence of VA deficiency or hyposignaling), has been shown to be neurotoxic and to impair memory (McCaffery *et al.*, 2003; Crandall *et al.*, 2004; Adams, 2010; Oliveira, 2015). This can explain why VA supplementation was deleterious on the performances of NTg+vitA animals in the Y-maze.

II. VA-enriched diet has an equivocal effect on VA status and hippocampal signaling according to the sex.

Within the target cell, retinol is turned by RALDH into RA which, through its nuclear receptors RARs and RXRs, modulates transcription of target genes (Lane & Bailey, 2005).

As there was a substantial effect of sex on serum retinol levels, we decided from there to consider both sexes separately. Transgenic females, but not males, displayed a reduced retinol status, and the VA supplementation interfered with none of the plasmatic retinol concentration of 3xTg-AD animals. Decreased retinol status observed in females is consistent with the data collected in elderly and AD patients (Bourdel-Marchasson *et al.*,

2001; Rinaldi *et al.*, 2003; Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018). It has already been reported in several studies that the use of a VA-enriched diet does not affect the circulating concentration (Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Minni, *et al.*, 2014; Letondor *et al.*, 2016). However, unchanged plasmatic retinol does not necessarily predict unchanged hippocampal retinoid signaling activity. As previously showed by Touyarot *et al.*, serum retinol was not increased by enriched-diet in aged rats, even though it improved hippocampal VA signaling and neurobiological processes underlying spatial memory (Touyarot *et al.*, 2013). Thus, our data are in line with the fact that circulating retinol is probably not always an appropriate marker of the cellular action of VA/ RA in the target tissues (Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Lopez-Teros *et al.*, 2014; Tanumihardjo, 2014).

On the contrary, as RARs and RXRs are ligand-inducible receptors and some of them display a retinoic acid responsive element in their promotor (Lane & Bailey, 2005; Blomhoff & Blomhoff, 2006; Navigatore Fonzo *et al.*, 2013; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014), the level of their expression is well admitted to be a marker of RA bioavailability and activity in the tissues (Enderlin, Alfos, *et al.*, 1997; Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b; Etchamendy *et al.*, 2003; Brtko *et al.*, 2007).

In order to understand the action of dietary VA on Alzheimer-type neuropathology, in the rest of the study, we focused our analyses on transgenic mice only. Our results showed contrasting effects of VA supplementation on hippocampal retinoid signaling activity in females and males. In females, the expression of RXR α was significantly reduced by VA-enriched diet, while in males, it tended to be increased, as well as the one of RXR γ . Thus, VA supplementation seems to activate retinoid signaling in male Tg group whereas, it surprisingly has an opposite effect in females. No effect of the diet on the expression of RARs was observed (data not shown). These observations are consistent with our results in the Y-maze where males were more abundant. Indeed, considering that central RA signaling is crucial for spatial and episodic-like memories (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b; Cocco *et al.*, 2002; Mingaud *et al.*, 2008; Olson & Mello, 2010; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014), the activation of RA hyposignaling was already shown to improve memory performance (Etchamendy, Enderlin, Marighetto, Vouimba, Pallet, Jaffard, & Higuieret, 2001b; Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Pallet, *et al.*, 2014).

As far as we know, sex-specific differences in retinoid metabolism and signaling at adulthood have been poorly studied. Thus, we cannot provide an explanation for the gender-induced discrepancies in the modulation of retinoid signaling by VA in AD model.

III. VA enrichment shows a beneficial effect on AD-neuropathology of males only.

The assessment of AD-neuropathology in 3xTg-AD mice revealed that VA-enriched diet had an opposite effect on the evolution of the neuropathology in males and females. In males, VA appeared to have a global beneficial effect. It led to a reduction of the hippocampal amyloid load (both soluble and insoluble A β ₄₀ and A β ₄₂), without affecting the expression of their precursor APP. In the same way, the exposure to VA-enriched diet, without modifying the total amount of Tau protein, reduced its phosphorylation, on PHF1 epitope found in AD brains (Martin *et al.*, 2011). This observation is consistent in males with the concomitant lowered expression of CDK5, an important kinase for tau phosphorylation, which expression and activity are regulated by RA (Lee & Kim, 2004; Ding *et al.*, 2008; Watamura *et al.*, 2016; Brossaud *et al.*, 2017). Conversely, in females, dietary VA had deleterious consequences by increasing the production of amyloid peptides, with no improvement of Tau pathology *i.e.* decreased amount of phosphorylated tau.

This sex-related difference in the amount of amyloid peptides produced in response to dietary VA cannot be explained by a connected differential expression of the enzymes involved in the APP processing: ADAM10, BACE, IDE. Indeed, no change in their protein expression was observed.

This observation is inconsistent with previous data reporting the importance of the retinoid signaling on the regulation of expression of enzymes implicated in the APP processing, whether it is the physiological or the pathological pathway (Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Holthoewer *et al.*, 2012; Wang, Chen, Liu, *et al.*, 2015).

Females had a worse amyloid pathology than males, which has already been reported (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Bories *et al.*, 2012; Vandal *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018) and could be an explanation why VA was inefficient for them. Close to our results in females, increasing retinol concentrations in cultured SH-SY5Y neuroblastoma cells has been shown to induce a higher production of amyloid peptides and tau-phosphorylation (Kunzler *et al.*, 2017). Furthermore, increased production of amyloid peptides in the hippocampus of Tg females fed with VA enriched-diet is consistent with the decreased hippocampal expression of RXR α , which activation has already been shown to reduce amyloid beta accumulation (You *et al.*, 2009; Kapoor *et al.*, 2013).

Results obtained in males were in line with *in vitro* and *in vivo* studies in AD models, which mainly report a therapeutic effect of retinoid treatments by reducing amyloid deposit (Tippmann *et al.*, 2009; Jarvis *et al.*, 2010; Holthoewer *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2013; Kitaoka *et al.*, 2013; Wang, Chen, Liu, *et al.*, 2015) and tau phosphorylation (Ding *et al.*, 2008).

Thus, our results showed for the first time an effect of VA nutritionally administrated on the Alzheimer-type neuropathology.

However, our data showed only slightly significant changes in RXR mRNA levels in response to the diet. To go further in the understanding of the relationship between dietary VA, RA signaling and the variation of β -amyloid deposits, we studied the correlation between RXRs mRNA levels and A β amounts in hippocampus (Fig. 29).

IV. The expression of RXRs is directly related to smaller amounts of amyloid peptides in the hippocampus of both female and male 3xTg-AD mice.

In the hippocampus of 14-month-old male and female 3xTg-AD mice (Tg and Tg+vit A), the expression of RXR β was highly inversely correlated to the amounts of soluble A β_{40} and A β_{42} . In a lesser extent, this was also the case for RXR γ only in male mice. This strong relationship between these receptors and A β deposits, suggest that they are implicated in the limitation of the pathological pathway of APP processing, however, our results do not provide explanation for the underlying mechanisms. We can suppose that RA is implicated in this control as we have recently showed that a 20 IU/g VA-enriched diet can provide VA to the hippocampus and induce an increased hippocampal RA concentration in aged rats (Dumetz *et al.*, 2019). Together, these results indicate that a decreased RA signaling, suggested by the inverse correlation between RXR β and A β peptides, seems to be deleterious for female 3xTg-AD as well as for males. This suggests that a retinoid therapy could be conceivable in females, however, with an alternative strategy to nutritional enrichment. This eventuality is consistent with the work of Takamura *et al.*, who showed that chronic administration of RA in female 3xTg-AD mice could enhance adult hippocampal neurogenesis and reduce the number of reactive astrocytes and active microglia (Takamura *et al.*, 2017).

V. Conclusion

The present study has evaluated the preventive action of dietary VA against AD neuropathology in the 3xTg-AD mouse model. We showed that a 6-month exposure to a VA-enriched diet, from 8 to 14 months of age, preserved spatial memory abilities in the Y-maze. VA supplementation partly alleviated the accumulation of A β and tau pathologies in males, whereas in females, VA treatment rather increased amyloid pathology, with no effect on tau. However, hippocampal retinoid X receptor expression was associated with lower A β levels in both sexes, but in a less marked way in females. Our results suggest that dietary VA supplementation could be considered as a strategy for the prevention of AD neuropathology in males, but likely not in females.

Therefore, the results of the present study highlight the absolute necessity of conducting research by systematically integrating females into preclinical and clinical research paradigms, especially for diseases such as AD which are affecting more women.

E. Figures

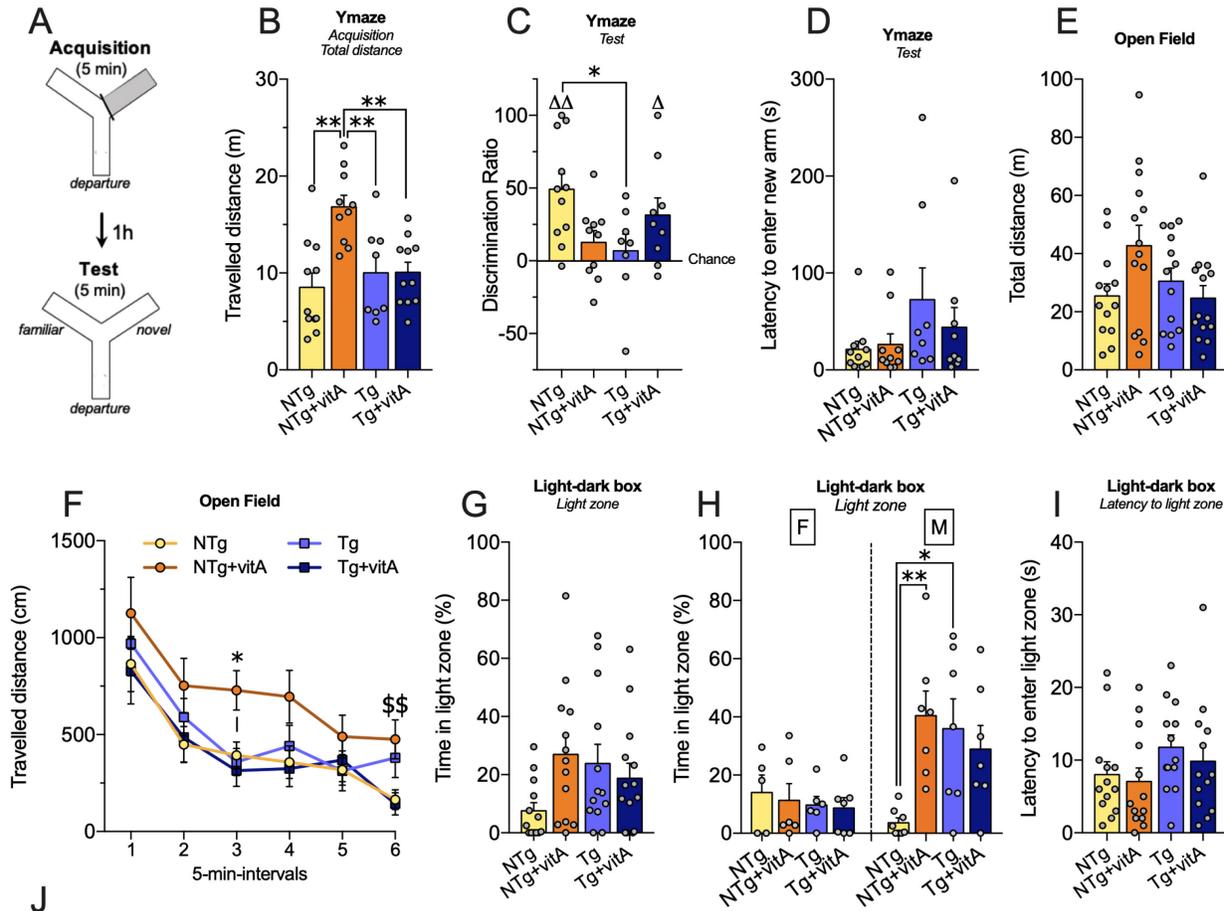


Figure	Variable	Variances	Genotype	Diet	Sex	Interactions	post-hoc analysis	
B	Total distance (Ymaze, acquisition)	equal	p=0.0204*	p=0.0056**	p=0.9470	Genotype x Diet : p=0.0097**	Tukey : **p<0.01	
C	Discrimination ratio (Ymaze, test)	equal	p=0.3379	p=0.9509	p=0.3743	Genotype x Diet : p=0.0032**	Tukey : *p<0.05	
H	Time in light zone (Light Dark box)	unequal	Kruskal Wallis test p=0.0665		p=0.1728	p=0.0012	Genotype x Diet : p=0.0298* Geno x Diet x Sex : p=0.0193**	Sex separated
H	Time in light zone (Light Dark box), females	equal	p=0.4610	p=0.6868	-	-	-	
H	Time in light zone (Light Dark box), males	unequal	Kruskal Wallis test p=0.0052**		-	-	Dunn : *p<0.05, **p<0.01	
I	Latency to light zone (Light Dark box)	equal	p=0.0782	p=0.5059	-	-	-	

Figure 26 – Vitamin A supplementation preserved memory performances of 3xTg-AD mice.

Data are expressed as mean±SEM. 14-month-old males and females are pooled unless indicated otherwise. (A): Protocol used for spatial recognition memory assessment in the Y-maze. Animals were allowed to freely explore only two arms of the apparatus for 5 min during the acquisition phase, starting in the departure arm. An hour later, access was open to the third arm for free exploration of the apparatus during the 5-min-lasting test phase. (B): Total distance travelled in the two available arms of the Y-maze during acquisition phase (n=8-11). (C): Discrimination ratio (DR) of the distance travelled in both familiar and novel arms. A positive DR is associated with a higher exploration of the novel arm, whereas a null or negative DR means no preference or a preference for the exploration of the familiar arm respectively. One-sample T-test comparison to chance level: Δ p<0.05, $\Delta\Delta$ p<0.01 (n=8-11) (D): Latency to enter the novel arm during the test phase. Kruskal-Wallis test : p=NS. (n=8-11) (E): Total distance travelled in the open field for 30 min. Kruskal-Wallis test : p=NS. (n=13-14) (F): Average distance travelled in the open-field for 30 min split in 5-min-intervals. Repeated three-way ANOVA: significant genotype x vit. A supplementation interaction (p<0.05) allowed analysis of each timepoint separately. Two-Way ANOVA

for each timepoint; when genotype x vit. A supplementation interaction was significant ($p < 0.05$), Tukey's post hoc test was performed : * $p < 0.01$: WT+vitA different from other groups. Genotype x vit.A supplementation was significant ($p = 0.0053$) but Tukey's post hoc test was not. (G): Time spent in the light zone of the light-dark box. Kruskal-Wallis test $p = \text{NS}$ ($n = 13-14$). (H): As sex effect was significant ($p < 0.01$) when females and males are pooled, the time spent in the light compartment by females, F ($n = 5-7$), and males, M ($n = 7-8$), was analyzed separately. (I): Latency to enter the light zone ($n = 13$). J: Statistical table for multifactorial ANOVA performed on behavioral parameters.

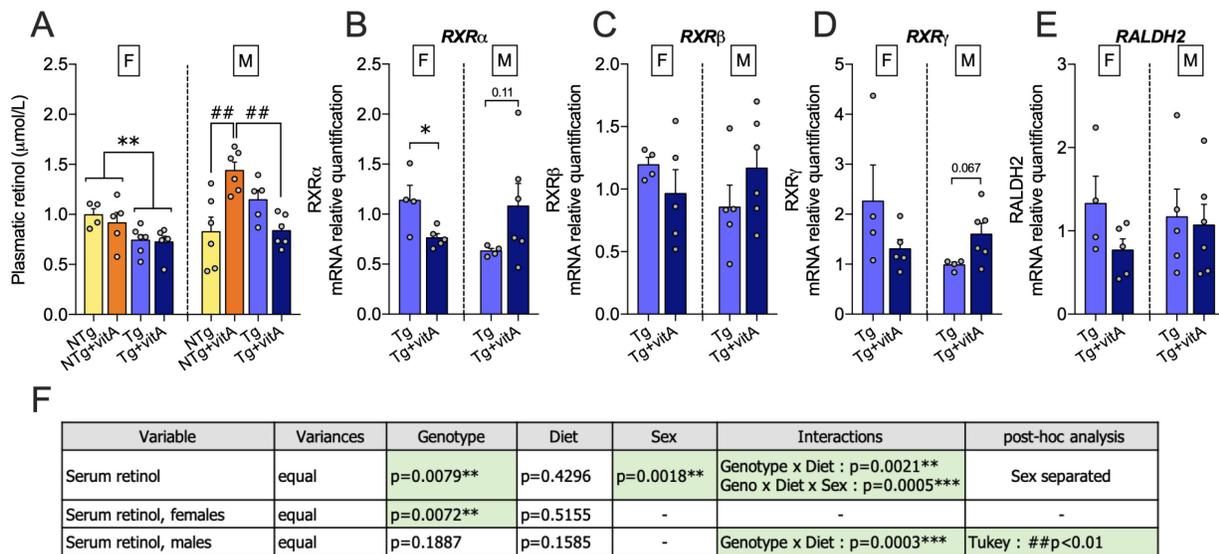


Figure 27 – Vitamin A status and signaling.

Data are expressed as mean \pm SEM. (A): Plasmatic concentration of retinol (females: $n=4-6$; males: $n=5-6$). (B-E): Relative expression of genes coding for Retinoid X Receptors (RXRs); $RXR\alpha$ (B), $RXR\beta$ (C), $RXR\gamma$ (D) and $RALDH2$ (E), the enzyme responsible for retinoic acid synthesis, obtained by RT-PCR in the hippocampus of 3xTg-AD females, F, and males, M (females: $n=4-5$; males: $n=4-6$). Unpaired t-test, $*p<0.05$ or Mann-Whitney comparison test was performed: Tg vs. Tg+vitA, $*p<0.05$. (F): Statistical table of multifactorial ANOVA performed on plasmatic concentration of retinol.

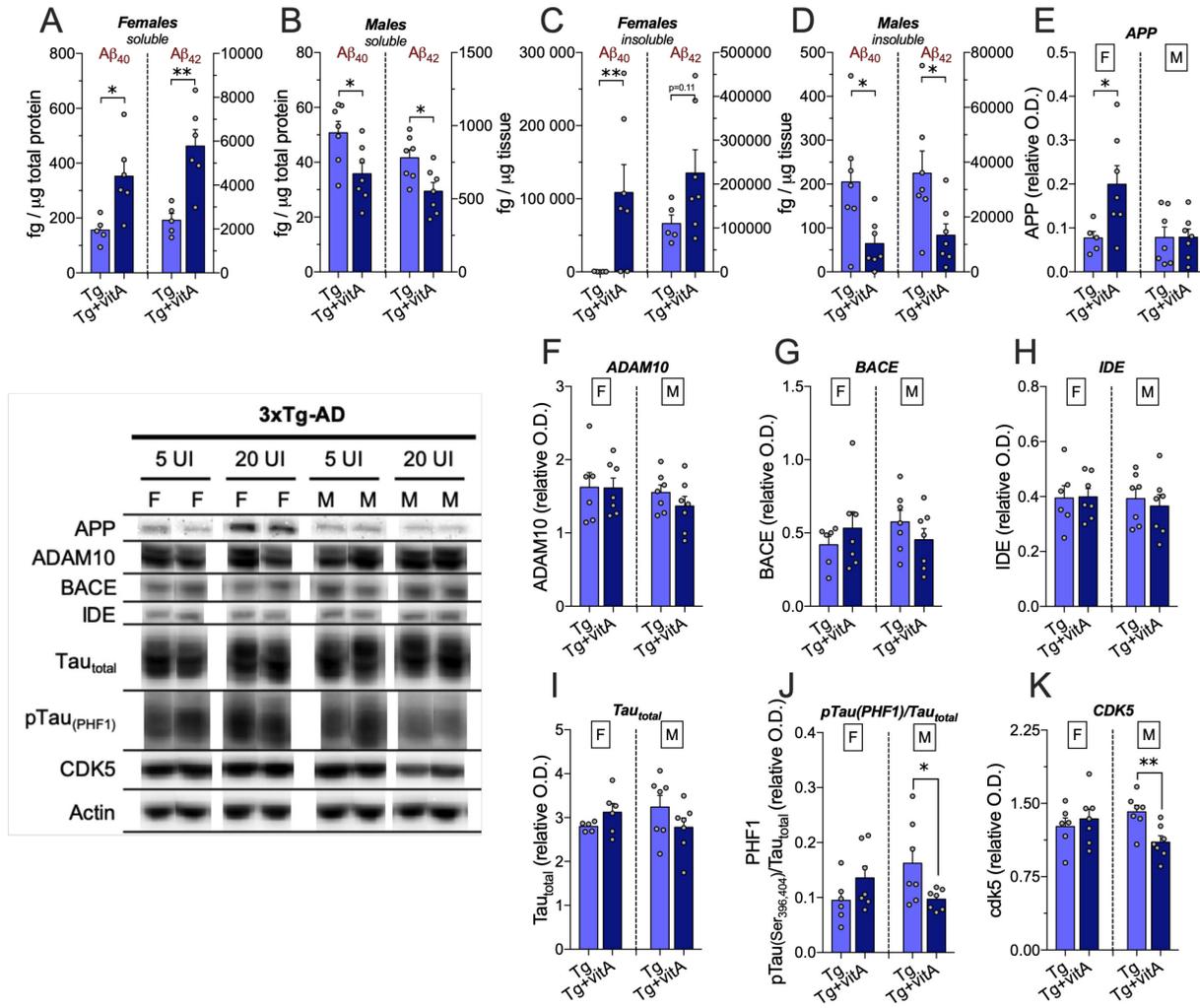


Figure 28 – Vitamin A-enriched diet reduced β -amyloid peptide production and tau-phosphorylation in male 3xTg-AD mice only.

Data are expressed as mean \pm SEM. (A-B): Amount of soluble $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in the hippocampus of female (A) and male (B) 3xTg-AD mice (females: n=5-6; males: n=7). (C-D): Amount of insoluble $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ in the hippocampus of female (C) and male (D) 3xTg-AD mice (females: n=5-7; males: n=7). A,B,D: Unpaired T-test : Tg vs. Tg+vitA, * p <0.05, ** p <0.01. C: Mann-Whitney test : Tg vs. Tg+vitA, ** p <0.01. (E-H): Expression of proteins involved in $A\beta$ -peptide production : Amyloid Precursor Protein (APP) (E) (females: n=5-7; males: n=7), ADAM10 (F), BACE (G) and IDE (H) (females: n=6-7; males: n=7) obtained by Western Blot in the hippocampus of female, F, and male, M, 3xTg-AD mice. Mann-Whitney test : Tg vs. Tg+vitA, * p <0.05. (I-K): Expression of soluble total Tau protein (I), phosphoTau on PHF1 epitope (females: n=5-7; males: n=7); (J) and CDK5, a major kinase for tau phosphorylation (K) obtained by Western Blot in the hippocampus of female, F, and male, M, 3xTg-AD mice (females: n=6-7; males: n=7). Mann-Whitney test : Tg vs. Tg+vitA, * p <0.05, ** p <0.01

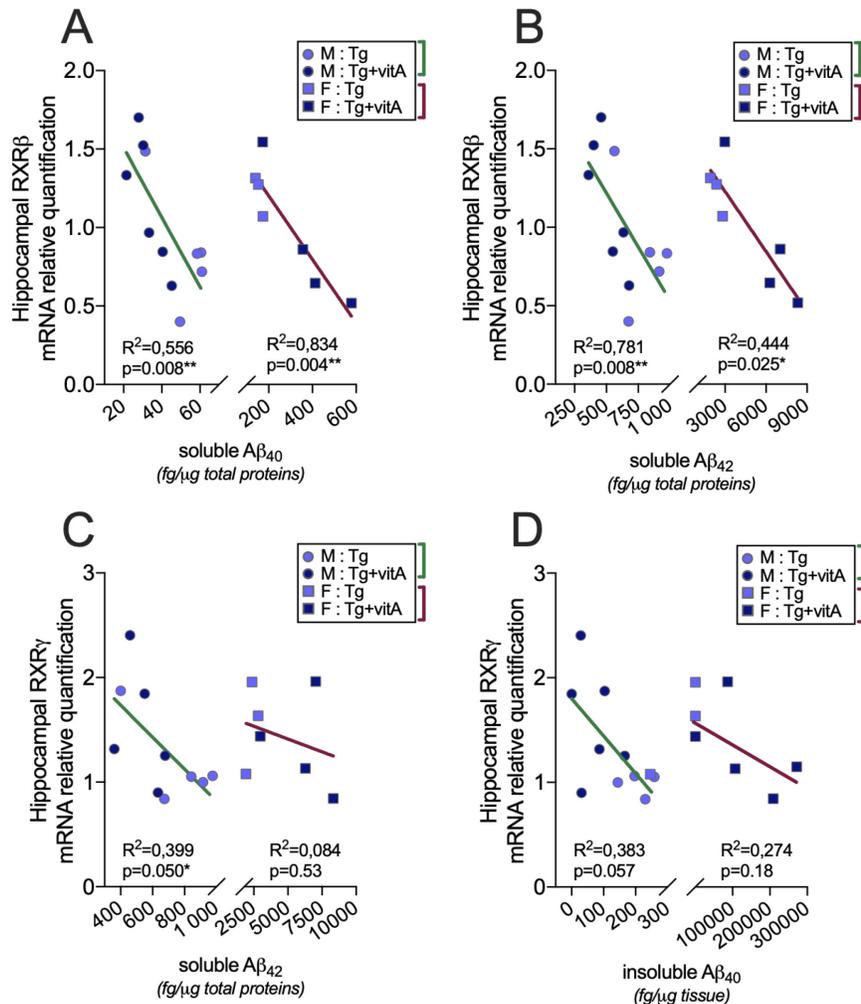


Figure 29 – Higher retinoid signaling is associated with reduced β -amyloid production in 3xTg-AD mice, regardless of vitamin A supplementation.

Data are expressed as mean \pm SEM. (A-B): Correlations between hippocampal RXR β mRNA expression and the amount of soluble A β_{40} and A β_{42} produced in the hippocampus of female and male 3xTg-AD mice (Tg and Tg+vitA pooled). Linear regression with Pearson's correlation. (C-D): Correlation between hippocampal RXR γ mRNA expression and the amount of soluble A β_{42} (C) and insoluble A β_{40} (D) produced in the hippocampus of female and male 3xTg-AD mice (Tg and Tg+vitA pooled). Pearson's correlation. Linear regression with Pearson's correlation.

Diet composition	Quantity (g per 100 g of diet)
Cellulose	2
Hydrochloric casein	18
Minerals (# 102)	1
Vitamins (without vitamin A)	1
Vitamin A	5 IU or 20 IU per g of diet
Methionine	0,1
Corn starch	45
Sugar	24.9
Arachid oil	2,5
Rapeseed oil	2,5

Tableau 10 – Composition of the diet.

Antibody	Host	Dilution	Supplier
<i>Primary antibodies</i>			
β -Actin	mouse	1:10 000	ABM
ADAM10	rabbit	1:1000	Millipore
APP (clone 6E10)	mouse	1:500	BioLegend
BACE	rabbit	1:500	Abcam
CDK5	rabbit	1:4000	Santa-Cruz Technologies
IDE	rabbit	1:4000	Abcam
RXR γ	rabbit	1:1000	Abcam
Tau (phospho Ser ₃₉₆ and Ser ₄₀₄)	mouse	1:1000	Generous gift from Peter Davies
Tau (total)	rabbit	1:20 000	Dako
<i>Secondary antibodies</i>			
Anti-mouse(HRP)	goat	1:60 000	Jackson
Anti-rabbit(HRP)	goat	1:60 000	Jackson

Tableau 11 – List of the antibodies used for Western Blot.



3xTg-AD

SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS CHEZ LE MODÈLE 3xTg-AD

1. Le régime enrichi en vitamine A préserve la mémoire spatiale à court-terme des souris 3xTg-AD.
2. Le régime enrichi en vitamine A tend à activer l'expression de RXR γ chez les souris 3xTg-AD mâles et inhibe l'expression de RXR α chez les souris 3xTg-AD femelles. Ainsi l'activité de la voie de signalisation de l'AR semble être stimulée par le régime chez les mâles 3xTg-AD uniquement.
3. Dans l'hippocampe, le régime enrichi en vitamine A s'est montré bénéfique sur les pathologies amyloïde et tau des souris 3xTg-AD mâles mais a aggravé la pathologie amyloïde des souris 3xTg-AD femelles et n'a pas eu d'effet sur la phosphorylation de tau des souris 3xTg-AD femelles.
4. L'expression hippocampique de RXR β/γ variait négativement avec la production de peptides A β dans l'hippocampe des souris 3xTg-AD mâles et femelles.

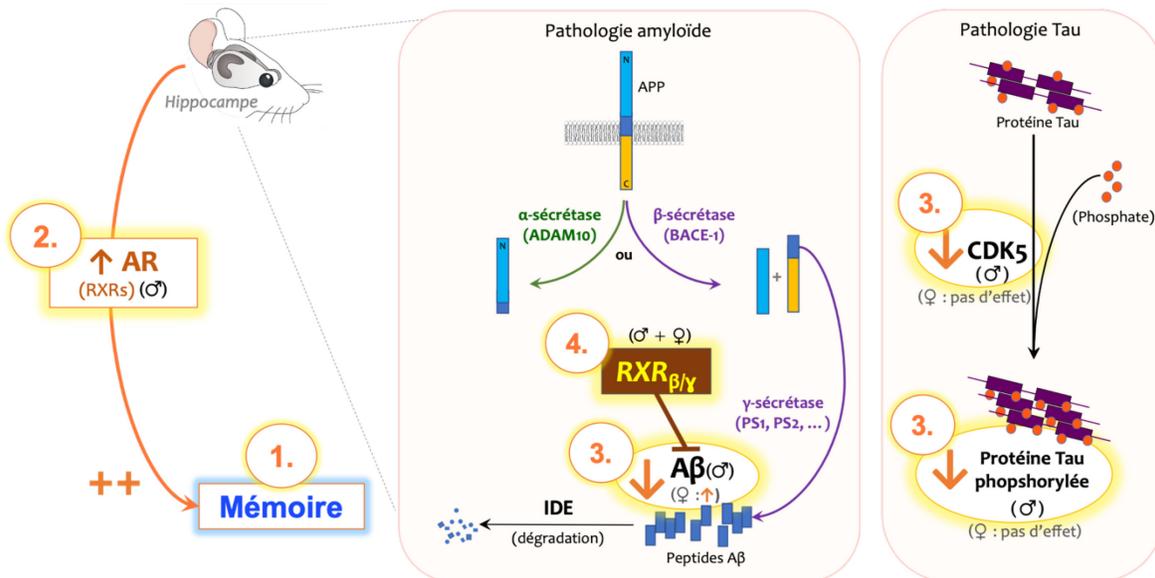


Figure 30 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le modèle de souris 3xTg-AD.

Conclusion générale

A. Synthèse des principaux résultats

L'acide rétinoïque, la forme active de la vitamine A, est crucial pour le maintien de la fonction cognitive, particulièrement pour les processus de mémoire, tout au long de la vie (Mey & McCaffery, 2004; Lane & Bailey, 2005; Ransom *et al.*, 2014; Stoney & McCaffery, 2016). Un ensemble de données de la littérature indique que l'activité de sa voie de signalisation diminue au cours du vieillissement ce qui contribue à la mise en place du déclin cognitif lié à l'âge (Enderlin, Alfos, *et al.*, 1997; Enderlin, Pallet, *et al.*, 1997; Feart, Mingaud, *et al.*, 2005; Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Brtko *et al.*, 2007; Touyarot *et al.*, 2013; Zeng, Chen, *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018; Dumetz *et al.*, 2019). Plus récemment, une perturbation du métabolisme hépatique de la vitamine A a été mise en évidence au cours du vieillissement. Elle conduit à une concentration hippocampique d'AR très significativement plus basse chez des rats âgés comparés à des jeunes. Cette faible concentration d'AR a été reliée à des altérations de l'arborisation dendritique des neurones de l'hippocampe et à de faibles performances de mémoire chez les animaux âgés (Dumetz *et al.*, 2019).

De plus, l'hyposignalisation de l'AR induite par une carence en vitamine A d'origine alimentaire a été associée à l'accumulation de peptides amyloïdes dans le cerveau de rat (Corcoran *et al.*, 2004), un des marqueurs caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, ainsi qu'à une atrophie du volume hippocampique et à une augmentation de la taille des ventricules, des changements anatomiques observés dans les maladies neurodégénératives (Ghenimi *et al.*, 2009). Dans ce contexte, nous avons étudié la capacité d'un régime enrichi en vitamine A à maintenir l'activité de la voie de signalisation de l'AR dans l'hippocampe, une structure cérébrale centrale dans la régulation des processus de mémoire (Neves *et al.*, 2008; Moser *et al.*, 2015; Lisman *et al.*, 2017; Voss *et al.*, 2017) chez deux modèles murins complémentaires de la maladie d'Alzheimer. L'objectif était d'évaluer la capacité de la vitamine A administrée par voie nutritionnelle à prévenir/limiter le développement de la neuropathologie Alzheimer et les altérations moléculaires et comportementales associées.

Chez les souris recevant une injection i.c.v de peptides A β_{25-35} , le régime enrichi en vitamine A a permis de préserver la mémoire spatiale de reconnaissance évaluée dans le labyrinthe en Y, après six semaines de régime. Jusqu'à la neuvième semaine de régime, la supplémentation en vitamine A a permis d'augmenter l'expression génique de la *Raldh2*, enzyme responsable de la synthèse de l'AR. Ce résultat suggère que la synthèse

hippocampique d'AR chez ces souris A β -injectées était stimulée ce qui peut être directement relié aux bonnes performances de mémoire de ces souris dans le labyrinthe en Y. De plus, l'expression des récepteurs de l'AR dans l'hippocampe, chez l'ensemble des animaux, corrélait positivement avec l'expression hippocampique d'Adam10 et Ide, des enzymes impliquées dans la transformation non-amyloïdogénique de l'APP et dans la dégradation des peptides amyloïdes respectivement. Cependant, les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer les effets protecteurs de la supplémentation en vitamine A depuis l'élévation de la production hippocampique d'AR à la préservation de la mémoire hippocampe-dépendante à court-terme n'ont pas pu être élucidés. Il semble toutefois que ces mécanismes n'impliquent pas une régulation de l'axe du stress de ces animaux par la vitamine A.

Chez les souris transgéniques 3xTg-AD, six mois de supplémentation nutritionnelle en vitamine A débutant à l'âge de 8 mois, a également permis de préserver la mémoire spatiale de reconnaissance évaluée dans le labyrinthe en Y. Nos travaux ont mis en évidence une différence liée au sexe dans la réponse à ce régime. En effet, l'activité de la voie de signalisation de l'AR est modulée par la supplémentation en vitamine A de façon opposée chez les mâles et les femelles. Ceci se traduit par une régulation opposée de l'expression des récepteurs de l'acide rétinoïque. Cet effet antagoniste de l'apport enrichi en vitamine A, selon le sexe, a également été observé sur la production de peptides amyloïdes. En effet, chez les mâles, la supplémentation a induit une diminution de la production hippocampique des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂, dans les fractions soluble et insoluble, ce qui peut être interprété comme un bénéfice, tandis que chez les femelles, l'exposition au régime a induit exactement l'inverse. De la même manière, chez le mâle uniquement, la vitamine A a permis de réduire l'expression de CDK5 dans l'hippocampe, l'une des principales kinases responsables de la phosphorylation de la protéine tau, et de façon cohérente, a également permis de réduire la quantité de protéines tau anormalement phosphorylées. Ces résultats suggèrent que la supplémentation en vitamine A a un effet bénéfique chez le mâle et délétère chez la femelle. Pourtant, chez les mâles comme chez les femelles, l'expression hippocampique de RXR β variait négativement avec l'accumulation de ces peptides. Ainsi, la diminution de l'activité de la voie de signalisation de l'AR serait bien néfaste pour les deux sexes, mais la supplémentation nutritionnelle en vitamine A stimulerait de manière bénéfique cette voie de signalisation chez les mâles et l'affaiblirait de manière délétère chez les femelles. Les données obtenues dans cette étude ne permettent pas de fournir d'explication de cet effet

différentiel de la vitamine A selon le sexe. La figure 31 récapitule sous forme de schéma l'ensemble des résultats obtenus.

Ensemble, nos résultats confirment que l'utilisation d'une approche nutritionnelle d'apport en vitamine A peut s'avérer avantageuse dans la prévention des atteintes mnésiques liées au développement des lésions de type Alzheimer, mais uniquement chez les mâles. Toutefois, les processus mis en œuvre dans cet effet protecteur nécessitent d'être mieux compris, identifiés et décrits avant d'envisager un bénéfice pour l'Homme.

L'interprétation et la discussion des résultats de chaque modèle ont été réalisées de façon plus approfondie dans les chapitres I et II. Ainsi, dans la discussion générale, nous nous attacherons à interpréter et à discuter les résultats et les limites de cette thèse dans leur ensemble et à mettre en exergue les questions soulevées par ce travail de thèse.

SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

1. Le régime enrichi en vitamine A préserve la mémoire spatiale à court-terme des deux modèles murins de la MA.
2. Cette préservation de la mémoire impliquerait une augmentation de l'activité de la voie de signalisation de l'AR chez les mâles.
3. Le régime enrichi en vitamine A a atténué la pathologie amyloïde et tau des souris 3xTg-AD mâles et a aggravé la pathologie amyloïde des souris 3xTg-AD femelles. Ce régime n'a pas eu d'effet sur la pathologie amyloïde du modèle A β , ni sur la pathologie tau des souris 3xTg-AD femelles.
4. L'expression des récepteurs de l'AR est associée à moins de production des A β (modèle 3xTg-AD) et à plus de production des enzymes protectrices vis-à-vis de ces peptides (modèle A β).

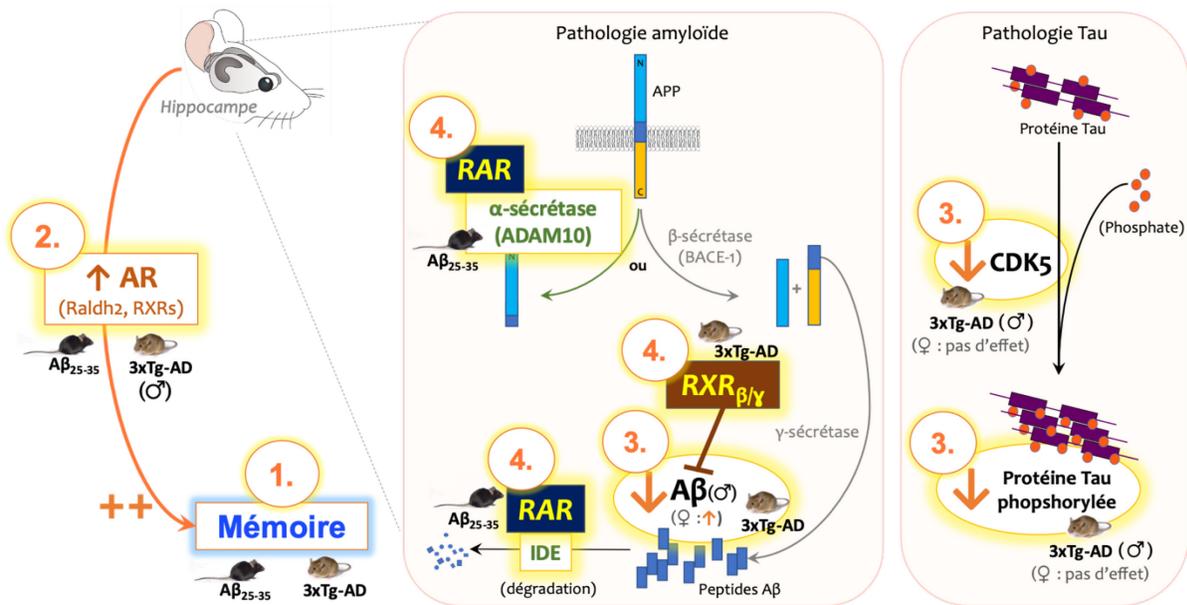


Figure 31 – Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus dans ce projet de thèse.

B. Discussion générale

I. Le rôle de la signalisation de l'AR dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer

L'une des observations marquantes de ce travail de thèse est le fait que l'exposition à un régime enrichi en vitamine A a pu préserver la mémoire spatiale de reconnaissance des deux modèles de la MA. Cet effet protecteur a été obtenu malgré le fait que l'induction de la pathologie Alzheimer chez ces deux modèles fait intervenir des processus très différents. D'un côté, le modèle d'injection i.c.v de peptides A β ₂₅₋₃₅ permet d'induire de façon très rapide l'amyloïdogénèse chez la souris, en s'affranchissant des dérèglements liés à l'âge. De l'autre côté, le modèle de souris transgénique 3xTg-AD développe au contraire progressivement, au cours du vieillissement, les pathologies amyloïde et tau humaines. Il intègre de ce fait les effets propres au vieillissement dans l'évolution de la neuropathologie. Ce second modèle, plus long à implémenter, permet cependant d'éviter des effets et les risques de la chirurgie stéréotaxique.

Des difficultés ont été rencontrées dans la mise en œuvre du modèle d'injection i.c.v, et nous ne retrouvons pas toujours les résultats décrits dans la littérature. Des différences peuvent s'expliquer par l'utilisation des souris de la souche C57BL/6. En effet, une grande majorité des études qui ont mis en œuvre ce modèle chez la souris, a plutôt utilisé la lignée de souris Swiss (Maurice, Lockhart, & Privat, 1996; Dall'Igna *et al.*, 2007; Chavant *et al.*, 2010; Isono *et al.*, 2013; Lahmy *et al.*, 2013; Meunier *et al.*, 2013; Naert *et al.*, 2015). Malgré tout, l'utilisation des deux modèles complémentaires crédite significativement l'efficacité de l'apport nutritionnel en Vitamine A dans la préservation du déclin de la mémoire dépendante de l'hippocampe dans un contexte de pathologie d'Alzheimer.

Nous avons pu constater que la supplémentation en vitamine A induisait une augmentation du niveau circulant de rétinol chez les souris A β mais pas les souris 3xTg-AD mâles. Ainsi, la supplémentation influence le statut en rétinol des souris jeunes, mais pas celui des souris âgées. Cet effet est contraire aux observations de Dumetz *et al.* 2019 qui montrent que le régime enrichi en vitamine A augmente les niveaux circulants de rétinol chez les rats âgés mais pas chez les rats jeunes adultes (Dumetz *et al.*, 2019). Cependant, il n'est pas rare que l'emploi d'un régime enrichi en vitamine A chez le rongeur n'induisse pas d'augmentation de la concentration circulante de rétinol (Touyarot *et al.*, 2013; Bonhomme, Minni, *et al.*,

2014; Letondor *et al.*, 2016). Pour autant, dans ces études sur le vieillissement, le régime enrichi en vitamine A a induit une amélioration des capacités mnésiques des animaux. Ainsi, une absence de modification du statut sanguin en rétinol ne signifie pas automatiquement que la vitamine A n'a pas eu d'effet au niveau cérébral. Ceci suggère que le statut circulant de rétinol n'est pas forcément un bon indicateur de l'activité de la voie de signalisation de l'AR dans les tissus cibles (Lopez-Teros *et al.*, 2014; Tanumihardjo, 2014; Borel & Desmarchelier, 2017), et donc dans le cerveau.

Pour comprendre les effets mnésiques d'un régime enrichi en vitamine A, ces études étudient le plus souvent l'expression génique des récepteurs de l'AR (Mingaud *et al.*, 2008; Letondor *et al.*, 2016; Bonhomme *et al.*, 2019) ou mesurent sa concentration (Dumetz *et al.*, 2019) dans l'hippocampe des animaux. En effet, une variation de l'expression des récepteurs nucléaires de l'AR, traduisant le niveau d'activité de sa signalisation, renseigne aussi de façon indirecte sur sa disponibilité tissulaire. En effet, ces récepteurs sont transactivés du fait de la présence de RARE et de RXRE dans le promoteur de leurs gènes (Navigatore Fonzo *et al.*, 2013; Asson-Batres & Rochette-Egly, 2014).

Dans les deux modèles de la MA mis en œuvre dans notre étude, l'expression hippocampique des récepteurs des rétinoïdes a été peu influencée par la supplémentation en vitamine A chez les mâles. Une étude plus poussée de l'activité des récepteurs, qui dépend notamment de leurs interactions, permettrait l'identification de leurs mécanismes d'action. Notamment, Kapoor *et al.* 2013 ont mis en évidence *in vitro* que l'hétérodimère RAR α /RXR α est impliqué dans la diminution de l'activité de la γ -sécrétase, et contribue à diminuer la production de peptide A β_{40} (Kapoor *et al.*, 2013). Kawahara *et al.* 2014 montrent *in vivo* que l'activation simultanée des récepteurs RAR α,β et RXR, avec l'aide d'agonistes spécifiques, est nécessaire pour diminuer l'accumulation de peptides A β chez la souris transgénique APP23 et augmenter l'expression d'IDE dans la fraction membranaire du cerveau .

Nos résultats sont dans la lignée de ces données, et suggèrent que la régulation de l'expression hippocampique d'ADAM10 et d'IDE pourrait être le résultat de l'hétérodimérisation d'un RAR, probablement le RAR α et/ou RAR γ avec RXR α (Tableau 9), et que l'accumulation des peptides A β_{40} et A β_{42} serait diminuée dès lors que l'expression des RXRs augmente (Fig. 28).

Concernant la pathologie tau, nous avons mis en évidence la diminution, induite par la vitamine A, de la phosphorylation de l'épitope PHF1 de tau et de l'expression de CDK5, la

kinase qui en est responsable dans l'hippocampe des souris mâles 3xTg-AD. L'étude des conséquences d'un régime enrichi en vitamine A sur la pathologie tau a donc été assez restreinte dans ce projet et aurait pu être davantage explorée. Cependant, considérant la littérature importante qui rapporte un lien entre la voie de signalisation des rétinoïdes et la pathologie amyloïde (Tableau 7), nous avons fait le choix de privilégier cette pathologie dans l'étude des effets protecteurs du régime enrichi en vitamine A. De plus, notre objectif était de suivre une stratégie de prévention, or des arguments de la littérature avancent que la pathologie amyloïde précéderait la pathologie tau (Fig. 32) (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2015). L'équipe à l'origine du modèle de souris transgénique 3xTg-AD rapporte aussi que les dépôts amyloïdes précèdent la formation des dégénérescences neurofibrillaires chez ces souris (Oddo, Caccamo, Kitazawa, *et al.*, 2003). Dans le modèle d'injection i.c.v, une hyperphosphorylation de tau a été rapportée (Lahmy *et al.*, 2013; Naert *et al.*, 2015) qui est forcément consécutive à l'injection du peptide A β ₂₅₋₃₅ dans les ventricules.

En conclusion, en dépit de l'identification des mécanismes exacts, l'exposition préventive à un régime enrichi en vitamine A semble bénéfique pour la prévention de la pathologie amyloïde d'abord, et tau dans une moindre mesure. Cependant, ces effets bénéfiques ne sont vrais que chez les souris mâles. En effet, toutes les manifestations de l'effet protecteur de la vitamine A ne sont pas valables chez la femelle 3xTg-AD.

Il est important de noter que si nos résultats sur l'effet bénéfique de la vitamine A sont cohérents avec notre hypothèse uniquement chez les mâles, ceci tient sans doute, au moins en partie, au fait que notre hypothèse a été élaborée uniquement à partir de données de la littérature obtenues chez des mâles.

Cette divergence de résultats chez le mâle et la femelle souligne une lacune concernant l'évaluation et la comparaison des effets du sexe dans les stratégies thérapeutiques vis-à-vis de la MA. Nous tenterons dans le paragraphe suivant d'apporter des éléments de réponse concernant cet effet différentiel de la vitamine A selon le sexe.

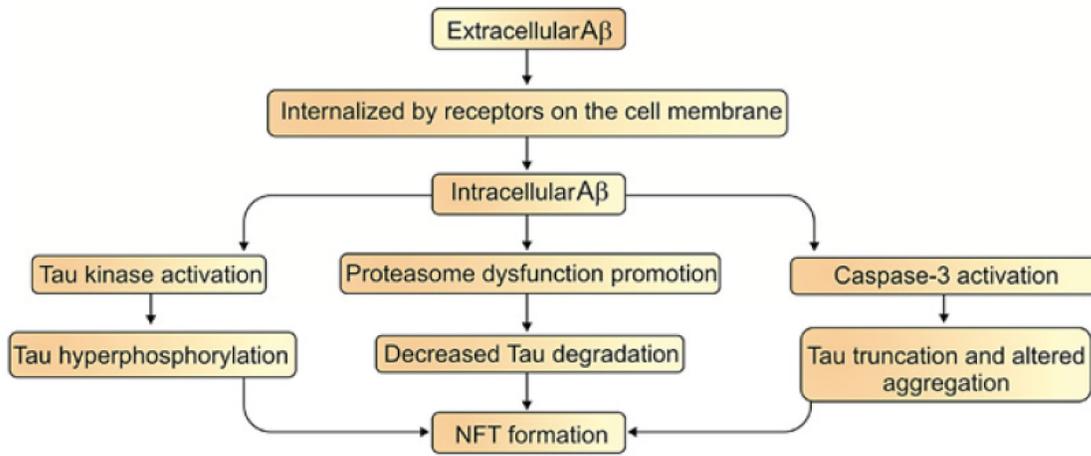


Figure 32 – Mécanismes proposés pour expliquer l'antériorité de la pathologie amyloïde vis-à-vis de la pathologie tau.
(Sadigh-Eteghad et al. 2015)

II. Les implications du sexe féminin dans la signalisation de l'AR et le risque de développer la maladie d'Alzheimer

De manière inattendue, notre projet a révélé l'effet opposé chez les mâles et les femelles du régime enrichi en vitamine A sur la production hippocampique des peptides amyloïdes.

Chez les femelles 3xTg-AD, le niveau sanguin de rétinol était plus faible que chez les non-transgéniques. Ceci est cohérent avec les données de la littérature obtenues chez des sujets atteints de déclin cognitif modéré ou des malades d'Alzheimer, dont la grande majorité était des femmes. La supplémentation en vitamine A n'a pas eu d'effet sur cette diminution du niveau de rétinol sanguin des femelles 3xTg-AD, par contre, dans ce groupe expérimental, les profils d'expression des récepteurs nucléaires et de l'enzyme de synthèse de l'AR dans l'hippocampe tendaient à être diminués par la supplémentation avec un effet significatif seulement sur RXR α . L'hypothèse selon laquelle les femelles auraient rencontré un problème pour absorber la vitamine A est à exclure, puisque si tel avait été le cas, l'expression hippocampique de RXR α n'aurait pas été significativement diminuée chez les souris supplémentées, mais surtout la pathologie amyloïde n'aurait pas été aggravée. (Là encore on observe que la concentration circulante en rétinol n'est pas un bon marqueur de l'activité de son métabolite l'AR.) Il semble donc clair que la vitamine A a bien été absorbée

par l'organisme de ces femelles. Alors, comment expliquer que le régime enrichi en vitamine A ait pu affaiblir la voie de signalisation de l'AR chez les femelles de manière diamétralement opposée à ce qui est observé chez les mâles ?

Ces données suggèrent que le métabolisme de la vitamine A est différent selon le sexe des souris dans notre modèle. Nous ne savons pas si cette différence est propre à la lignée 3xTg-AD, ou si elle se généralise chez la souris, voire au-delà, dans d'autres espèces. Chez le rat Wistar adulte, l'expression des récepteurs de l'AR est plus faible dans l'hippocampe des femelles par rapport aux mâles (Arfaoui *et al.*, 2013), mais nous ne savons pas si cette différence existe également chez la souris. Aucune étude, à notre connaissance, n'a caractérisé le métabolisme de la vitamine A de la souris 3xTg-AD.

De même, très peu de données existent sur la différence de métabolisme de la vitamine A selon le sexe en général, depuis l'absorption, le stockage hépatique, la régulation sanguine et jusqu'à l'entrée dans les tissus cibles. Pourtant, il est très bien admis dans la littérature que la vitamine A, *via* la voie de signalisation de l'AR, est nécessaire à la gamétogenèse masculine et féminine qui fait intervenir des processus différents. Par exemple, la différenciation des cellules germinales en ovocytes se produit au cours de la vie embryonnaire tandis que leur différenciation en spermatozoïdes ne débute pas avant la naissance (Clagett-Dame & Knutson, 2011; Teletin *et al.*, 2017).

Chez l'adulte, l'AR continue de maintenir la spermatogenèse chez l'homme et permet la folliculogenèse et la régulation de la synthèse ovarienne des hormones sexuelles féminines, les œstrogènes et la progestérone, chez la femme (Damdimopoulou *et al.*, 2019). Ainsi, il existe bien une spécificité d'action de la voie des rétinoïdes selon le sexe.

La stimulation avec de l'estradiol (l'œstrogène le plus actif), suite à une ovariectomie chez la ratte, induit une augmentation de l'expression de la RALDH2, l'enzyme de synthèse de l'AR, dans l'utérus. Petrosino *et al.* 2014 rapportent que les œstrogènes régulent l'expression des RALDHs de façon tissu-dépendante chez la femelle et qu'il existe un élément de réponse aux œstrogènes dans le promoteur de la Raldh2. Dans le cerveau, la RALDH2 est majoritairement exprimée dans les méninges et dans l'hippocampe. Ces informations interrogent sur l'état du statut en œstrogènes de nos souris 3xTg-AD et de la régulation de la RALDH2 par ces œstrogènes dans leur hippocampe.

Dans notre étude, les souris 3xTg-AD étaient âgées de 14 mois au moment de l'euthanasie, un âge relativement avancé qui pose la question de leur proximité physiologique avec la ménopause. La transition vers la ménopause se caractérise notamment par une baisse de

la production de la progestérone et des œstrogènes à partir de la mi-vie et aboutit à une perte de fertilité (Catenaccio *et al.*, 2016). Les femelles 3xTg-AD de notre étude peuvent donc tout à fait avoir commencé leur transition vers la ménopause, voire être post-ménopausées. Or, la période transitoire de la pré-ménopause à la ménopause serait une des causes du risque accru de développer la MA chez les femmes (pour revue : (Scheyer *et al.*, 2018)).

Mosconi *et al.* 2018 ont mesuré à trois ans d'intervalle l'évolution de biomarqueurs de la MA chez des femmes pré-, péri- et post-ménopausées ayant une fonction cognitive normale, et les ont comparés à ceux d'hommes d'âge équivalent. Les femmes post-ménopausées ont présenté des dépôts amyloïdes supérieurs à ceux des trois autres groupes, ainsi qu'une diminution plus importante du volume hippocampique et du métabolisme central du glucose, mesuré par imagerie au FDG-TEP (Fluoro-DésoxyGlucose, Tomographie par Émission de Positrons) (Fig. 33) (Mosconi *et al.*, 2018).

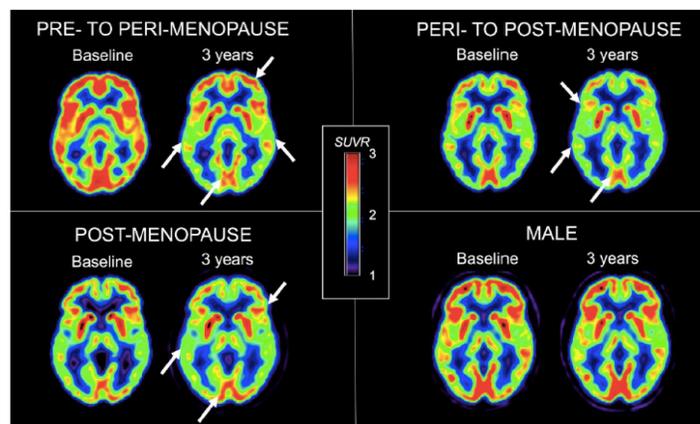


Figure 33 – Métabolisme central du glucose chez des personnes présentant une fonction cognitive normale mesuré par FDG-TEP.

Les mesures ont été réalisées une première fois au début de l'étude puis une deuxième fois, trois ans après. En haut à gauche : une femme pré-ménopausée au début de l'étude devenue péri-ménopausée à l'issue des 3 ans. En haut à droite : une femme qui était péri-ménopausée au début de l'étude et post-ménopausée à la fin. En bas à gauche : une femme qui était déjà post-ménopausée au début de l'étude. En bas à droite : un homme.

Nos souris 3xTg-AD présentaient également une pathologie amyloïde significativement supérieure à celle des mâles, ce qui avait déjà été rapporté dans la littérature avec ce modèle (Hirata-Fukae *et al.*, 2008; Carroll *et al.*, 2010; Vandal *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). Dans ces études, cette aggravation de la pathologie chez les femelles apparaissait à partir de l'âge de 12 mois (Vandal *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018), mais n'était pas observée à 9 mois (Hirata-Fukae *et al.*, 2008). Ceci indique qu'au-delà de 9 mois d'âge, un basculement

vers une pathologie plus prononcée semble se produire uniquement chez les femelles faisant inévitablement penser à la transition vers la ménopause. De plus, l'exposition de souris femelles 3xTg-AD ovariectomisées à un régime enrichi en phyto-œstrogènes pendant 9 mois atténue la pathologie amyloïde de ces souris et améliore leurs performances dans le labyrinthe en Y (Zhao *et al.*, 2013).

Enfin, Sárvári *et al.* 2015 ont procédé à l'ovariectomie de rattes âgées de 13 mois et ont évalué les effets de 29 jours de traitement à l'estradiol sur l'expression d'une multitude de gènes dans l'hippocampe, par une analyse transcriptomique. Parmi tous les gènes dont l'expression a été stimulée par ce traitement, une partie code pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'AR et comprend, entre autres, Stra6, le transporteur facilitant l'entrée du rétinol dans la cellule cible, mais aussi la Raldh2 (Sárvári *et al.*, 2015).

Ainsi, compte-tenu de l'âge des souris femelles 3xTg-AD de notre étude et des éléments rassemblés à partir des données de la littérature, nous pouvons supposer que ces femelles sont entrées dans la transition vers la ménopause, et qu'il en résulte une diminution de la production d'œstrogènes par leurs ovaires. Cette réduction de synthèse pourrait avoir comme conséquence une moindre entrée du rétinol dans l'hippocampe et une moindre synthèse locale d'AR *via* une diminution de l'expression de Stra6 et de la Raldh2. On peut ainsi supposer que la vitamine A apportée par le régime n'est pas métabolisée de façon optimale chez la femelle et ne peut ainsi exercer son effet inhibiteur de l'amyloïdogénèse comme observé chez le mâle. Cette supposition est également cohérente avec le fait que l'expression hippocampique des récepteurs des rétinoïdes corrèle négativement avec l'accumulation des peptides A β chez les deux sexes. Ceci suggère que la voie nutritionnelle d'administration de la vitamine A ne convient pas aux femelles, sans que pour autant l'hypothèse de travail initiale statuant sur l'effet bénéfique de l'AR ne soit remise en question.

Toutefois, nous ne sommes pas parvenus à réunir d'arguments pour expliquer que le régime enrichi en vitamine A induise une stimulation de la production de peptides A β chez les femelles. Il faudrait admettre que la vitamine A supplémentaire prive encore davantage l'hippocampe de vitamine A, comme si cet enrichissement nutritionnel pouvait profiter à un autre organe que le cerveau, au détriment de l'hippocampe. Connaissant le rôle de la signalisation de l'AR dans la synthèse des hormones sexuelles féminines (Damdimopoulou *et al.*, 2019), l'enrichissement en vitamine A pourrait être préférentiellement utilisé par les ovaires dans le but de pallier la baisse de production des œstrogènes au cours du passage

vers la ménopause. Or, les ovaires abritent la 17 β -HSD2, une enzyme qui transforme l'estradiol en estrone, une forme d'œstrogène beaucoup moins active. L'expression de cette enzyme est stimulée par l'AR dans l'ovaire (Yamagata *et al.*, 2015; Yilmaz & Bulun, 2019). Ainsi, les niveaux circulants d'estradiol pourraient être encore davantage réduits sous l'effet d'un supplément d'AR ovarien, et cette « sur-réduction » pourrait expliquer une « sur-perturbation » du métabolisme de la vitamine A et de la signalisation cérébrale de l'AR. La confirmation de cette hypothèse mécanistique confirmerait par la même occasion un besoin accru de vitamine A chez la femelle ménopausée.

En résumé, la transition vers la ménopause, la réduction de la production et de la disponibilité des œstrogènes et ses effets négatifs sur la voie des rétinoïdes dans le cerveau pourraient vraisemblablement être en jeu dans l'effet différent -selon le sexe- du régime enrichi en vitamine A sur la pathologie des souris 3xTg-AD que nous avons obtenu. Cependant, pour pouvoir véritablement tester cette hypothèse, une investigation moléculaire complète des hormones sexuelles présentes dans les ovaires, le plasma et le cerveau, ainsi que l'expression de leurs récepteurs serait nécessaire. Cet effet potentiel des œstrogènes souligne l'importance d'intégrer aux études sur la maladie d'Alzheimer la caractérisation des changements physiologiques dus au vieillissement, susceptibles d'interférer avec la modélisation de la maladie.

En conclusion, l'utilisation du régime enrichi en vitamine A n'apparaît pas comme une bonne solution pour protéger les souris femelles de la neuropathologie type Alzheimer.

Enfin, il est nécessaire de souligner qu'il existe une domination de l'utilisation exclusive de modèles mâles dans la littérature, et très peu d'études qui incluent les deux sexes à la fois, ce qui limite la possibilité de confronter les effets du sexe dans le contexte de la MA et restreint la possibilité de comparer nos résultats à la littérature.

De façon générale, il est primordial que la recherche préclinique et clinique intègre l'étude des effets du sexe sur les pathologies qui affectent l'Homme, telles que la maladie d'Alzheimer, et ne se limite pas à étudier l'un des deux sexes ou à l'étude cloisonnée de l'un indépendamment de l'autre. En particulier, cette exigence est particulièrement fondamentale pour les pathologies comme la maladie d'Alzheimer, qui sont connues pour affecter de manière préférentielle un sexe plutôt que l'autre (Tableau 12) (Ostan *et al.*, 2016).

Table 1 Number of deaths, percentage of total deaths by sex regarding the 14 leading causes of death in U.S.A. in 2013
Data refer to all races and all ages. Adapted from [14].

Rank	Cause of death	Male		Female		Higher mortality for
		Number	Total deaths (%)	Number	Total deaths (%)	
1	Heart disease	321,347	24.6	289,758	22.4	♂
2	Malignant neoplasms	307,559	23.5	277,322	21.5	♂
3	Chronic lower respiratory diseases	70,317	5.4	78,888	6.1	♀
4	Accidents (unintentional injuries)	81,916	6.3	48,641	3.8	♂
5	Cerebrovascular diseases	63,691	4.1	75,287	5.8	♀
6	Alzheimer's disease	25,836	2.0	58,931	4.6	♀
7	Diabetes mellitus	39,841	3.1	35,737	2.8	♂
8	Influenza and pneumonia	26,804	2.1	30,175	2.3	♀
9	Kidney diseases	23,493	1.8	23,619	1.8	=
10	Suicide	32,055	2.5	9,094	0.7	♂
11	Septicaemia	17,994	1.4	20,162	1.6	♀
12	Chronic liver disease and cirrhosis	23,709	1.8	12,718	1.0	♂
13	Essential hypertension-related diseases	12,963	1.0	17,807	1.4	♀
14	Parkinson's disease	15,088	1.2	10,108	0.8	♂
15	All other causes	253,421	19.4	302,707	23.5	♂

Tableau 12 – Récapitulatif des 14 principales causes de décès aux États-Unis en 2013 et le sexe qu'elles impactent préférentiellement.

(Ostan et al. 2016)

III. La vitamine A nutritionnelle: un traitement préventif pour l'Homme?

Les bienfaits d'une bonne alimentation sur la santé générale sont de plus en plus reconnus. L'utilisation d'une approche nutritionnelle pour prévenir le déclin cognitif lié à l'âge et le risque de développer la maladie d'Alzheimer a notamment été mise en avant (Gustafson *et al.*, 2015; Milte & McNaughton, 2016; Morris, 2016; Dominguez & Barbagallo, 2018; Cremonini *et al.*, 2019). Nos données renforcent l'idée qu'un régime enrichi en vitamine A serait à privilégier compte-tenu de la régulation exercée par la voie de signalisation de l'AR sur les mécanismes participant au développement de la pathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

Pour pouvoir mettre en œuvre cette stratégie de prévention chez l'Homme, il faudrait être capable d'identifier les sujets qui présentent un affaiblissement de la voie de signalisation de l'AR. Les options qui existent actuellement pour déterminer l'état du statut en vitamine A chez un sujet se restreignent presque exclusivement à la mesure du rétinol sanguin (Tanumihardjo, 2011; Borel & Desmarchelier, 2017). Or, la concentration circulante en rétinol est extrêmement bien régulée par le foie qui adapte son stockage ou son relargage de façon à maintenir cette concentration constante (O'Byrne & Blaner, 2013; Li *et al.*, 2014; Borel & Desmarchelier, 2017). Le rétinol sanguin n'est de ce fait pas nécessairement un bon indicateur de l'activité de la voie de l'AR (Feart, Pallet, *et al.*, 2005; Tanumihardjo, 2011;

Lopez-Teros *et al.*, 2014; Tanumihardjo, 2014), ce qui est confirmé par les données que nous avons obtenues. Ainsi, l'élaboration d'autres marqueurs de l'activité de la signalisation de l'AR est nécessaire.

Une possibilité serait de mesurer l'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules mononuclées du sang. En effet, Féart *et al.* 2005 ont montré que si la concentration sérique de rétinol de sujets âgés n'était pas différente de celle des sujets jeunes, les sujets âgés présentaient en revanche une diminution significative de l'expression de RAR γ dans les cellules mononuclées du sang (Féart, Pallet, *et al.*, 2005). De plus, la corrélation entre l'expression de ce récepteur et le rétinol sérique observée chez les sujets jeunes était perdue chez les sujets âgés (Féart, Pallet, *et al.*, 2005). En outre, Dumetz *et al.* 2019 ont observé que l'exposition à un régime enrichi en vitamine A chez le rat âgé a stimulé la production hippocampique d'AR et que la concentration d'AR plasmatique corrélait positivement avec la concentration d'AR hippocampique (Dumetz *et al.*, 2019). Cette supplémentation en vitamine A a permis de normaliser les performances de mémoire des animaux âgés. Ces données positionnent l'AR circulant comme un bon marqueur potentiel de son activité cérébrale. La confirmation de cette supposition permettrait d'avoir à disposition un marqueur fiable et facile à mesurer.

Par ailleurs, tous les sujets ne présentent pas la même vulnérabilité au déclin de l'activité de la voie de l'AR au cours du vieillissement. Il existe peu de données concernant les facteurs intervenant dans cette variabilité. Toutefois, la piste génétique semble être un élément de réponse. En effet, il semblerait que le polymorphisme de gènes impliqués dans les étapes d'absorption, de transport, de stockage ou de métabolisme de la vitamine A pourrait avoir des conséquences sur sa disponibilité systémique (pour revue : (Borel & Desmarchelier, 2017)). Par exemple, la présence de certains SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans les gènes codant pour la RBP4 et la TTR influencerait directement la concentration sanguine de rétinol (Borel & Desmarchelier, 2017). L'identification de ces polymorphismes et de leurs conséquences sur la biodisponibilité de la vitamine A dans l'organisme contribuerait à adapter les recommandations nutritionnelles pour chaque sujet. Par exemple, un sujet pour lequel un bagage génétique moins efficace dans la conversion du β -carotène en rétinol aura été identifié, recevra pour recommandation de manger préférentiellement des esters de rétinol (Borel & Desmarchelier, 2017). Les liens existants entre ces polymorphismes génétiques et la disponibilité systémique de vitamine A ont été très faiblement étudiés et mériteraient d'être davantage explorés.

Considérant la place centrale qu'occupent les récepteurs des rétinoïdes dans la régulation de voies de signalisation impliquant des hormones ou des nutriments, l'évolution du statut hormonal et du statut nutritionnel des sujets au cours du vieillissement est également susceptible d'influencer l'activité de la voie de signalisation de l'AR avec l'âge.

Ainsi, il existe encore des incertitudes concernant les mécanismes qui sous-tendent l'affaiblissement de l'activité de la voie de signalisation de l'AR au cours du vieillissement. La validation de nouveaux marqueurs permettrait d'identifier les sujets qui présentent une vulnérabilité à la diminution de l'activité de cette voie. L'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules mononucléées du sang, le dosage de l'AR plasmatique, ou encore la détection de polymorphismes de gènes impliqués dans l'absorption, le métabolisme et le stockage de la vitamine A pourraient constituer de potentiels biomarqueurs. La validation de ceux-ci devrait notamment inclure l'effet du sexe notamment.

IV. Conclusion générale

Au vu des échecs successifs des approches curatives de la maladie d'Alzheimer, de la population qui vieillit et du nombre de patients Alzheimer qui ne cesse de croître, il semble nécessaire de privilégier l'élaboration de stratégies de prévention. L'approche nutritionnelle présente les avantages d'être peu coûteuse et non invasive, ce qui en fait une stratégie de premier choix considérant l'envergure du problème sociétal que représente la maladie d'Alzheimer actuellement.

Nous avons montré que la supplémentation nutritionnelle en vitamine A est une piste à considérer pour prévenir la maladie d'Alzheimer, grâce à l'utilisation de deux modèles murins de la maladie.

Nos travaux ont contribué à mettre en avant que les mécanismes impliqués dans le développement de la neuropathologie caractéristique de la maladie d'Alzheimer ne sont pas identiques selon le sexe. Or la maladie d'Alzheimer affecte beaucoup plus de femmes. Le fait que les dérégulations moléculaires caractéristiques de la MA débutent bien avant l'apparition des symptômes cognitifs laisse penser que la prévalence supérieure chez les femmes n'est pas une simple conséquence de leur espérance de vie qui est plus longue. Ainsi, les travaux réalisés dans cette thèse devraient encourager la recherche préclinique sur Alzheimer à prendre en compte l'effet du sexe et ne pas privilégier l'utilisation de modèles animaux mâles sous couvert de postulat d'universalité mâle/femelle qui est très probablement inexact.

À l'échelle individuelle, le maintien d'un bon statut en vitamine A, et de l'activité de la signalisation de l'AR en aval, ne doit pas être considéré comme une fin en soi. Il doit s'inscrire dans une hygiène de vie saine de façon globale et pérenne pour préserver les capacités cognitives tout au long de la vie, et optimiser ses chances de connaître un vieillissement réussi.

Enfin, l'administration de vitamine A par voie nutritionnelle à des personnes âgées dans le but de prévenir la maladie d'Alzheimer n'est pas encore d'actualité. Le rétinol sanguin n'étant pas un bon indicateur de l'activité de la signalisation de l'AR, l'utilisation de marqueurs de son activité, tels que l'expression des récepteurs de l'AR dans les cellules mononuclées du sang ou la concentration d'AR circulante, doivent au préalable être validés. Les causes qui conduisent à l'affaiblissement de la voie de signalisation de l'AR chez certains sujets au cours du vieillissement doivent également être davantage explorées. De plus, les mécanismes moléculaires par lesquels la signalisation de l'AR parviendrait à empêcher ou atténuer l'initiation des processus pathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer méritent d'être approfondis. L'ensemble de ces éléments pourra peut-être permettre à l'avenir de prévenir la maladie d'Alzheimer par une approche nutritionnelle impliquant la vitamine A.

Bibliographie

- A Armstrong, R. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, **57**, 87–105.
- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G.D., Ruff, E., & Slutsky, I. (2009) Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat. Neurosci*, **12**, 1567–1576.
- Adams, J. (2010) The neurobehavioral teratology of retinoids: a 50-year history. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol*, **88**, 895–905.
- Agostinho, P., Pliássova, A., Oliveira, C.R., & Cunha, R.A. (2015) Localization and Trafficking of Amyloid- β Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis*, **45**, 329–347.
- Alzheimer's Association (2016) 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, **12**, 459–509.
- Amengual, J., Zhang, N., Kemerer, M., Maeda, T., Palczewski, K., & Lintig, von, J. (2014) STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis. *Hum. Mol. Genet*, **23**, 5402–5417.
- Aoto, J., Nam, C.I., Poon, M.M., Ting, P., & Chen, L. (2008) Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron*, **60**, 308–320.
- Aravinthan, A. (2015) Cellular senescence: a hitchhiker's guide. *Hum. Cell*, **28**, 51–64.
- Arfaoui, A., Lobo, M.V.T., Boulbaroud, S., Ouichou, A., Mesfioui, A., & Arenas, M.I. (2013) Expression of retinoic acid receptors and retinoid X receptors in normal and vitamin A deficient adult rat brain. *Ann. Anat*, **195**, 111–121.
- Arsenault, D., Dal-Pan, A., Tremblay, C., Bennett, D.A., Guitton, M.J., De Koninck, Y., Tonegawa, S., & Calon, F. (2013) PAK inactivation impairs social recognition in 3xTg-AD Mice without increasing brain deposition of tau and A β . *J. Neurosci*, **33**, 10729–10740.
- Asson-Batres, M.A. & Rochette-Egly, C. (2014) *The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level*. Springer.
- Asson-Batres, M.A. & Rochette-Egly, C. (2016) *The Biochemistry of Retinoid Signaling II*. Springer.
- Aubry, E.M. & Odermatt, A. (2009) Retinoic acid reduces glucocorticoid sensitivity in C2C12 myotubes by decreasing 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and glucocorticoid receptor activities. *Endocrinology*, **150**, 2700–2708.
- Bachmeier, C., Beaulieu-Abdelahad, D., Crawford, F., Mullan, M., & Paris, D. (2013) Stimulation of the retinoid X receptor facilitates beta-amyloid clearance across the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci*, **49**, 270–276.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011) Alzheimer's disease. *Lancet*, **377**, 1019–1031.
- Balmer, J.E. & Blomhoff, R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *J. Lipid Res*, **43**, 1773–1808.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., Holtzman, D.M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P.S., Ghetti, B., Klunk, W.E., McDade, E., Martins, R.N., Masters, C.L., Mayeux, R., Ringman, J.M., Rossor, M.N., Schofield, P.R., Sperling, R.A., Salloway, S., Morris, J.C., Dominantly Inherited Alzheimer Network (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*, **367**, 795–804.
- Behairi, N., Belkhefha, M., Rafa, H., Labsi, M., Deghbar, N., Bouzid, N., Mesbah-Amroun, H., & Touil-Boukoffa, C. (2016) All-trans retinoic acid (ATRA) prevents

- lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment in aged rats. *J Neuroimmunol*, **300**, 21–29.
- Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Robles, V., Yuste, R., & DeFelipe, J. (2013) Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cereb. Cortex*, **23**, 1798–1810.
- Berbis, P. (2010) [Retinoids: mechanisms of action]. *Ann Dermatol Venereol*, **137 Suppl 3**, S97–S103.
- Bilkei-Gorzo, A. (2014) Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther*, **142**, 244–257.
- Blaner, W.S. (2019) Vitamin A signaling and homeostasis in obesity, diabetes, and metabolic disorders. *Pharmacol. Ther*, **197**, 153–178.
- Blomhoff, R. & Blomhoff, H.K. (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol*, **66**, 606–630.
- Bohlen und Halbach, von, O., Zacher, C., Gass, P., & Unsicker, K. (2006) Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J. Neurosci. Res*, **83**, 525–531.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., & Mann, J.J. (2018) Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, **22**, 589–599.e5.
- Bonhomme, D., Alfos, S., Webster, S.P., Wolff, M., Pallet, V., & Touyarot, K. (2019) Vitamin A deficiency impairs contextual fear memory in rats: abnormalities in glucocorticoid pathway. *Journal of Neuroendocrinology*, jne.12802.
- Bonhomme, D., Minni, A.M., Alfos, S., Roux, P., Richard, E., Higuieret, P., Moisan, M.P., Pallet, V., & Touyarot, K. (2014) Vitamin A status regulates glucocorticoid availability in Wistar rats: consequences on cognitive functions and hippocampal neurogenesis? *Front Behav Neurosci*, **8**, 20.
- Bonhomme, D., Pallet, V., Dominguez, G., Servant, L., Henkous, N., Lafenetre, P., Higuieret, P., Beracochea, D., & Touyarot, K. (2014) Retinoic acid modulates intrahippocampal levels of corticosterone in middle-aged mice: consequences on hippocampal plasticity and contextual memory. *Front Aging Neurosci*, **6**, 6.
- Bonnet, E., Touyarot, K., Alfos, S., Pallet, V., Higuieret, P., & Abrous, D.N. (2008) Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS ONE*, **3**, e3487.
- Borel, P. & Desmarchelier, C. (2017) Genetic Variations Associated with Vitamin A Status and Vitamin A Bioavailability. *Nutrients*, **9**, 246.
- Bories, C., Guitton, M.J., Julien, C., Tremblay, C., Vandal, M., Msaid, M., De Koninck, Y., & Calon, F. (2012) Sex-dependent alterations in social behaviour and cortical synaptic activity coincide at different ages in a model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, **7**, e46111.
- Bourassa, P., Tremblay, C., Schneider, J.A., Bennett, D.A., & Calon, F. (2019) Beta-amyloid pathology in human brain microvessel extracts from the parietal cortex: relation with cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, **137**, 801–823.
- Bourdel-Marchasson, I., Delmas-Beauvieux, M.C., Peuchant, E., Richard-Harston, S., Decamps, A., Reignier, B., Emeriau, J.P., & Rainfray, M. (2001) Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing*, **30**, 235–241.
- Breton, A., Casey, D., & Arnaoutoglou, N.A. (2019) Cognitive tests for the detection of mild cognitive impairment (MCI), the prodromal stage of dementia: Meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Int J Geriatr Psychiatry*, **34**, 233–242.

- Brossaud, J., Roumes, H., Helbling, J.-C., Moisan, M.-P., Pallet, V., Ferreira, G., Biyong, E.-F., Redonnet, A., & Corcuff, J.-B. (2017) Retinoic acid increases glucocorticoid receptor phosphorylation via cyclin-dependent kinase 5. *Mol. Cell. Neurosci*, **82**, 96–104.
- Brtko, J., Rock, E., Nezbedova, P., Krizanova, O., Dvorcakova, M., Minet-Quinard, R., Farges, M.-C., Ribalta, J., Winklhofer-Roob, B.M., Vasson, M.-P., & Macejova, D. (2007) Age-related change in the retinoid X receptor beta gene expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers: effect of 13-cis retinoic acid supplementation. *Mech. Ageing Dev*, **128**, 594–600.
- Bureau, A., Zussy, C., Delair, B., Ogier, C., Ixart, G., Maurice, T., & Givalois, L. (2013) Deregulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis functions in an Alzheimer's disease rat model. *Neurobiol. Aging*, **34**, 1426–1439.
- Buhling, K.J. & Laakmann, E. (2014) The effect of micronutrient supplements on male fertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol*, **26**, 199–209.
- Burke, S.N. & Barnes, C.A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci*, **7**, 30–40.
- Campbell, N.L., Unverzagt, F., LaMantia, M.A., Khan, B.A., & Boustani, M.A. (2013) Risk factors for the progression of mild cognitive impairment to dementia. *Clin. Geriatr. Med*, **29**, 873–893.
- Canet, G., Chevallier, N., Zussy, C., Desrumaux, C., & Givalois, L. (2018) Central Role of Glucocorticoid Receptors in Alzheimer's Disease and Depression. *Front Neurosci*, **12**, 739.
- Cantorna, M.T., Snyder, L., & Arora, J. (2019) Vitamin A and vitamin D regulate the microbial complexity, barrier function, and the mucosal immune responses to ensure intestinal homeostasis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*, **54**, 184–192.
- Cañete, A., Cano, E., Muñoz-Chápuli, R., & Carmona, R. (2017) Role of Vitamin A/Retinoic Acid in Regulation of Embryonic and Adult Hematopoiesis. *Nutrients*, **9**, 159.
- Cardillo, G. de M., De-Paula, V. de J.R., Ikenaga, E.H., Costa, L.R., Catanozi, S., Schaeffer, E.L., Gattaz, W.F., Kerr, D.S., & Forlenza, O.V. (2018) Chronic Lithium Treatment Increases Telomere Length in Parietal Cortex and Hippocampus of Triple-Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *J. Alzheimers Dis*, **63**, 93–101.
- Carman, M.B. (1997) The psychology of normal aging. *Psychiatr. Clin. North Am*, **20**, 15–24.
- Carmona, J.J. & Michan, S. (2016) Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev. Invest. Clin*, **68**, 7–16.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., & Colin-Barenque, L. (2014) Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev*, **2014**, 795375.
- Carroll, J.C., Rosario, E.R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentschein, E., Stanczyk, F.Z., & Pike, C.J. (2010) Sex differences in β -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res*, **1366**, 233–245.
- Caruso, A., Nicoletti, F., Gaetano, A., & Scaccianoce, S. (2019) Risk Factors for Alzheimer's Disease: Focus on Stress. *Front Pharmacol*, **10**, 976.
- Caruso, A., Nicoletti, F., Mango, D., Saidi, A., Orlando, R., & Scaccianoce, S. (2018) Stress as risk factor for Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res*, **132**, 130–134.
- Casali, B.T., Reed-Geaghan, E.G., & Landreth, G.E. (2018) Nuclear receptor agonist-driven modification of inflammation and amyloid pathology enhances and sustains cognitive improvements in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, **15**, 43–11.

- Catenaccio, E., Mu, W., & Lipton, M.L. (2016) Estrogen- and progesterone-mediated structural neuroplasticity in women: evidence from neuroimaging. *Brain Struct Funct*, **221**, 3845–3867.
- Chakrabarti, M., McDonald, A.J., Will Reed, J., Moss, M.A., Das, B.C., & Ray, S.K. (2016) Molecular Signaling Mechanisms of Natural and Synthetic Retinoids for Inhibition of Pathogenesis in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis*, **50**, 335–352.
- Chambon, C., Wegener, N., Gravius, A., & Danysz, W. (2011) Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid-beta peptides in rodents. *Behav. Brain Res*, **225**, 623–641.
- Chavant, F., Deguil, J., Pain, S., Ingrand, I., Milin, S., Fauconneau, B., Pérault-Pochat, M.-C., & Lafay-Chebassier, C. (2010) Imipramine, in part through tumor necrosis factor alpha inhibition, prevents cognitive decline and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **332**, 505–514.
- Chen, L., Lau, A.G., & Sarti, F. (2014) Synaptic retinoic acid signaling and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, **78**, 3–12.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F., & Evans, R.M. (1998) An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron*, **21**, 1353–1361.
- Ciesielska, N., Sokołowski, R., Mazur, E., Podhorecka, M., Polak-Szabela, A., & Kędziora-Kornatowska, K. (2016) Is the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) test better suited than the Mini-Mental State Examination (MMSE) in mild cognitive impairment (MCI) detection among people aged over 60? Meta-analysis. *Psychiatr. Pol*, **50**, 1039–1052.
- Cifarelli, V. & Eichmann, A. (2019) The Intestinal Lymphatic System: Functions and Metabolic Implications. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, **7**, 503–513.
- Clagett-Dame, M. & Knutson, D. (2011) Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*, **3**, 385–428.
- Clemens, V., Regen, F., Le Bret, N., Heuser, I., & Hellmann-Regen, J. (2018) Retinoic Acid Enhances Apolipoprotein E Synthesis in Human Macrophages. *J. Alzheimers Dis*, **61**, 1295–1300.
- Cocco, S., Diaz, G., Stancampiano, R., Diana, A., Carta, M., Curreli, R., Sarais, L., & Fadda, F. (2002) Vitamin A deficiency produces spatial learning and memory impairment in rats. *Neuroscience*, **115**, 475–482.
- Corcoran, J.P., So, P.L., & Maden, M. (2004) Disruption of the retinoid signalling pathway causes a deposition of amyloid beta in the adult rat brain. *Eur. J. Neurosci*, **20**, 896–902.
- Coronel, R., Palmer, C., Bernabeu-Zornoza, A., Monteagudo, M., Rosca, A., Zambrano, A., & Liste, I. (2019) Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural Regen Res*, **14**, 1661–1671.
- Cosco, T.D., Howse, K., & Brayne, C. (2017) Healthy ageing, resilience and wellbeing. *Epidemiol Psychiatr Sci*, **26**, 579–583.
- Coskren, P.J., Luebke, J.I., Kabaso, D., Wearne, S.L., Yadav, A., Rumbell, T., Hof, P.R., & Weaver, C.M. (2015) Functional consequences of age-related morphologic changes to pyramidal neurons of the rhesus monkey prefrontal cortex. *J Comput Neurosci*, **38**, 263–283.
- Cramer, P.E., Cirrito, J.R., Wesson, D.W., Lee, C.Y., Karlo, J.C., Zinn, A.E., Casali, B.T., Restivo, J.L., Goebel, W.D., James, M.J., Brunden, K.R., Wilson, D.A., & Landreth, G.E. (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, **335**, 1503–1506.

- Crandall, J., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W.E., & McCaffery, P. (2004) 13-cis-retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **101**, 5111–5116.
- Cremonini, A.L., Caffa, I., Cea, M., Nencioni, A., Odetti, P., & Monacelli, F. (2019) Nutrients in the Prevention of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, **2019**, 9874159–20.
- Cuadrado-Tejedor, M., Ricobaraza, A., Del Río, J., Frechilla, D., Franco, R., Pérez-Mediavilla, A., & Garcia-Osta, A. (2011) Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation. *Behav. Brain Res*, **220**, 338–343.
- D'Ambrosio, D.N., Clugston, R.D., & Blaner, W.S. (2011) Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients*, **3**, 63–103.
- Dall'Igna, O.P., Fett, P., Gomes, M.W., Souza, D.O., Cunha, R.A., & Lara, D.R. (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp. Neurol*, **203**, 241–245.
- Damdipoulou, P., Chiang, C., & Flaws, J.A. (2019) Retinoic acid signaling in ovarian folliculogenesis and steroidogenesis. *Reprod. Toxicol*, **87**, 32–41.
- Dammann, C., Stapelfeld, C., & Maser, E. (2019) Expression and activity of the cortisol-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is tissue and species-specific. *Chem. Biol. Interact*, **303**, 57–61.
- de Urquiza, A.M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R.H., Griffiths, W., Sjovall, J., & Perlmann, T. (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*, **290**, 2140–2144.
- De Winter, G. (2015) Aging as disease. *Med Health Care Philos*, **18**, 237–243.
- Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G.F., & Gold, L.H. (2000) Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem*, **73**, 31–48.
- DeMarshall, C.A., Nagele, E.P., Sarkar, A., Acharya, N.K., Godsey, G., Goldwaser, E.L., Kosciuk, M., Thayasivam, U., Han, M., Belinka, B., Nagele, R.G., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016) Detection of Alzheimer's disease at mild cognitive impairment and disease progression using autoantibodies as blood-based biomarkers. *Alzheimers Dement (Amst)*, **3**, 51–62.
- Dhikav, V. & Anand, K. (2011) Potential predictors of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*, **28**, 1–11.
- Ding, Y., Qiao, A., Wang, Z., Goodwin, J.S., Lee, E.S., Block, M.L., Allsbrook, M., McDonald, M.P., & Fan, G.H. (2008) Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J. Neurosci*, **28**, 11622–11634.
- Dominguez, L.J. & Barbagallo, M. (2018) Nutritional prevention of cognitive decline and dementia. *Acta Biomed*, **89**, 276–290.
- Dumetz, F., Buré, C., Alfos, S., Bonneau, M., Richard, E., Touyarot, K., Marie, A., Schmitter, J.-M., Bosch-Bouju, C., & Pallet, V. (2019) Normalization of hippocampal retinoic acid level corrects age-related memory deficits in rats. *Neurobiol. Aging*.
- Dunn, A.R. & Kaczorowski, C.C. (2019) Regulation of intrinsic excitability: Roles for learning and memory, aging and Alzheimer's disease, and genetic diversity. *Neurobiol Learn Mem*, **164**, 107069.
- Dziechciaż, M. & Filip, R. (2014) Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging. *Ann Agric Environ Med*, **21**, 835–838.
- Eckel-Mahan, K.L. & Storm, D.R. (2009) Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears. *EMBO Rep*, **10**, 584–591.

- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) (2015) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin A. *EFSA Journal*, **13**, 4028.
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., & De Gasperi, R. (2010) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med*, **77**, 69–81.
- Enderlin, V., Alfos, S., Pallet, V., Garcin, H., Azais-Braesco, V., Jaffard, R., & Higuieret, P. (1997) Aging decreases the abundance of retinoic acid (RAR) and triiodothyronine (TR) nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett*, **412**, 629–632.
- Enderlin, V., Higuieret, D., Alfos, S., Husson, M., Jaffard, R., Higuieret, P., & Pallet, V. (2000) Vitamin A Deficiency Decreases the Expression of RAR β and RXR β/γ in Adult Mouse Brain: Effect of RA Administration. *Nutr Neurosci*, **3**, 173–181.
- Enderlin, V., Pallet, V., Alfos, S., Dargelos, E., Jaffard, R., Garcin, H., & Higuieret, P. (1997) Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neurosci. Lett*, **229**, 125–129.
- Endres, K., Fahrenholz, F., Lotz, J., Hiemke, C., Teipel, S., Lieb, K., Tüscher, O., & Fellgiebel, A. (2014) Increased CSF APPs- α levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology*, **83**, 1930–1935.
- Esteban, J.A. (2004) Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide. *Trends Neurosci*, **27**, 1–3.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Pallet, V., Higuieret, P., & Jaffard, R. (2003) Vitamin A deficiency and relational memory deficit in adult mice: relationships with changes in brain retinoid signalling. *Behav. Brain Res*, **145**, 37–49.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., & Higuieret, P. (2001a) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci*, **21**, 6423–6429.
- Etchamendy, N., Enderlin, V., Marighetto, A., Vouimba, R.M., Pallet, V., Jaffard, R., & Higuieret, P. (2001b) Alleviation of a selective age-related relational memory deficit in mice by pharmacologically induced normalization of brain retinoid signaling. *J. Neurosci*, **21**, 6423–6429.
- Fagan, A.M., Mintun, M.A., Mach, R.H., Lee, S.-Y., Dence, C.S., Shah, A.R., LaRossa, G.N., Spinner, M.L., Klunk, W.E., Mathis, C.A., DeKosky, S.T., Morris, J.C., & Holtzman, D.M. (2006) Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann. Neurol*, **59**, 512–519.
- Fan, X., Wheatley, E.G., & Villeda, S.A. (2017) Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. *Annu. Rev. Neurosci*, **40**, 251–272.
- Farrer, L.A., Cupples, L.A., Haines, J.L., Hyman, B., Kukull, W.A., Mayeux, R., Myers, R.H., Pericak-Vance, M.A., Risch, N., & van Duijn, C.M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, **278**, 1349–1356.
- Feart, C., Mingaud, F., Enderlin, V., Husson, M., Alfos, S., Higuieret, P., & Pallet, V. (2005) Differential effect of retinoic acid and triiodothyronine on the age-related hypo-expression of neurogranin in rat. *Neurobiol. Aging*, **26**, 729–738.
- Feart, C., Pallet, V., Boucheron, C., Higuieret, D., Alfos, S., Letenneur, L., Dartigues, J.F., & Higuieret, P. (2005) Aging affects the retinoic acid and the triiodothyronine nuclear receptor mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Endocrinol*, **152**, 449–458.
- Filali, M., Lalonde, R., Theriault, P., Julien, C., Calon, F., & Planel, E. (2012) Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav. Brain Res*, **234**, 334–342.

- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M., Walhovd, K.B., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014) What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog. Neurobiol*, **117**, 20–40.
- Foidl, B.M. & Humpel, C. (2020) Can mouse models mimic sporadic Alzheimer's disease? *Neural Regen Res*, **15**, 401–406.
- GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, **388**, 1459–1544.
- GBD 2016 Dementia Collaborators (2019) Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*, **18**, 88–106.
- Gerstner, J.R. & Yin, J.C.P. (2010) Circadian rhythms and memory formation. *Nat. Rev. Neurosci*, **11**, 577–588.
- Ghenimi, N., Beauvieux, M.-C., Biran, M., Pallet, V., Higuere, P., & Gallis, J.-L. (2009) Vitamin A deficiency in rats induces anatomic and metabolic changes comparable with those of neurodegenerative disorders. *J. Nutr*, **139**, 696–702.
- Golini, R.S., Delgado, S.M., Navigatore Fonzo, L.S., Ponce, I.T., Lacoste, M.G., & Anzulovich, A.C. (2012) Daily patterns of clock and cognition-related factors are modified in the hippocampus of vitamin A-deficient rats. *Hippocampus*, **22**, 1720–1732.
- Goncalves, M.B., Clarke, E., Hobbs, C., Malmqvist, T., Deacon, R., Jack, J., & Corcoran, J.P. (2013) Amyloid beta inhibits retinoic acid synthesis exacerbating Alzheimer disease pathology which can be attenuated by an retinoic acid receptor alpha agonist. *Eur J Neurosci*, **37**, 1182–1192.
- Goodman, A.B. (2006) Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset Alzheimer disease. *J. Cell. Physiol*, **209**, 598–603.
- Goodman, A.B. & Pardee, A.B. (2003) Evidence for defective retinoid transport and function in late onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 2901–2905.
- Goodman, T., Crandall, J.E., Nanescu, S.E., Quadro, L., Shearer, K., Ross, A., & McCaffery, P. (2012) Patterning of retinoic acid signaling and cell proliferation in the hippocampus. *Hippocampus*, **22**, 2171–2183.
- Götz, J., Bodea, L.-G., & Goedert, M. (2018) Rodent models for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci*, **19**, 583–598.
- Götz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N., & Ittner, L.M. (2007) A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol*, **17**, 91–103.
- Graham, W.V., Bonito-Oliva, A., & Sakmar, T.P. (2017) Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu. Rev. Med*, **68**, 413–430.
- Gustafson, D.R., Clare Morris, M., Scarmeas, N., Shah, R.C., Sijben, J., Yaffe, K., & Zhu, X. (2015) New Perspectives on Alzheimer's Disease and Nutrition. *J. Alzheimers Dis*, **46**, 1111–1127.
- Hampel, B., Wagner, M., Teis, D., Zwerschke, W., Huber, L.A., & Jansen-Dürr, P. (2005) Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell*, **4**, 325–330.
- Hampel, H., O'Bryant, S.E., Molinuevo, J.L., Zetterberg, H., Masters, C.L., Lista, S., Kiddle, S.J., Batrla, R., & Blennow, K. (2018) Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. *Nat Rev Neurol*, **14**, 639–652.

- Harada, C.N., Natelson Love, M.C., & Triebel, K.L. (2013) Normal cognitive aging. *Clin. Geriatr. Med*, **29**, 737–752.
- Harrison, E.H. (2005) Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu. Rev. Nutr*, **25**, 87–103.
- Harrison, E.H. (2012) Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 70–77.
- Harrisson, S.E., Shooman, D., & Grundy, P.L. (2012) A prospective study of the safety and efficacy of frameless, pinless electromagnetic image-guided biopsy of cerebral lesions. *Neurosurgery*, **70**, 29–33–discussion33.
- Haskell, M.J. (2012) The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: β -carotene bioavailability and conversion--evidence in humans. *Am. J. Clin. Nutr*, **96**, 1193S–203S.
- Hirata-Fukae, C., Li, H.-F., Hoe, H.-S., Gray, A.J., Minami, S.S., Hamada, K., Niikura, T., Hua, F., Tsukagoshi-Nagai, H., Horikoshi-Sakuraba, Y., Mughal, M., Rebeck, G.W., LaFerla, F.M., Mattson, M.P., Iwata, N., Saido, T.C., Klein, W.L., Duff, K.E., Aisen, P.S., & Matsuoka, Y. (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res*, **1216**, 92–103.
- Holt, S.E., Wright, W.E., & Shay, J.W. (1997) Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer*, **33**, 761–766.
- Holthoewer, D., Endres, K., Schuck, F., Hiemke, C., Schmitt, U., & Fahrenholz, F. (2012) Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis*, **10**, 224–228.
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., & Bohr, V.A. (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, **1**, 444–17.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., & Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, **274**, 99–102.
- Hsu, T.M. & Kanoski, S.E. (2014) Blood-brain barrier disruption: mechanistic links between Western diet consumption and dementia. *Front Aging Neurosci*, **6**, 88.
- Huang, X., Zhang, H., Zhen, J., Dong, S., Guo, Y., Van Halm-Lutterodt, N., & Yuan, L. (2018) Diminished circulating retinol and elevated α -TOH/retinol ratio predict an increased risk of cognitive decline in aging Chinese adults, especially in subjects with ApoE2 or ApoE4 genotype. *Aging (Albany NY)*, **10**, 4066–4083.
- Hussain, M.M. (2014) Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol*, **25**, 200–206.
- Husson, M., Enderlin, V., Alfos, S., Boucheron, C., Pallet, V., & Huguere, P. (2004) Expression of neurogranin and neuromodulin is affected in the striatum of vitamin A-deprived rats. *Brain Res. Mol. Brain Res*, **123**, 7–17.
- Idres, N., Marill, J., Flexor, M.A., & Chabot, G.G. (2002) Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers. *J. Biol. Chem*, **277**, 31491–31498.
- Iqbal, J. & Hussain, M.M. (2009) Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, **296**, E1183–E1194.
- Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C.-X. (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol*, **12**, 15–27.
- Isono, T., Yamashita, N., Obara, M., Araki, T., Nakamura, F., Kamiya, Y., Alkam, T., Nitta, A., Nabeshima, T., Mikoshiba, K., Ohshima, T., & Goshima, Y. (2013) Amyloid- β_{25-35} induces impairment of cognitive function and long-term potentiation through phosphorylation of collapsin response mediator protein 2. *Neurosci. Res*, **77**, 180–185.

- Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., Sperling, R., Contributors (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, **14**, 535–562.
- Jaroudi, W., Garami, J., Garrido, S., Hornberger, M., Keri, S., & Moustafa, A.A. (2017) Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus. *Rev Neurosci*, **28**, 705–714.
- Jarvis, C.I., Goncalves, M.B., Clarke, E., Dogruel, M., Kalindjian, S.B., Thomas, S.A., Maden, M., & Corcoran, J.P. (2010) Retinoic acid receptor-alpha signalling antagonizes both intracellular and extracellular amyloid-beta production and prevents neuronal cell death caused by amyloid-beta. *Eur J Neurosci*, **32**, 1246–1255.
- Jayasingh Chellammal, H.S., Veerachamy, A., Ramachandran, D., Gummadi, S.B., Manan, M.M., & Yellu, N.R. (2019) Neuroprotective effects of 1`δ-1`-acetoxyeugenol acetate on Aβ(25-35) induced cognitive dysfunction in mice. *Biomed. Pharmacother*, **109**, 1454–1461.
- Jongsiriyanyong, S. & Limpawattana, P. (2018) Mild Cognitive Impairment in Clinical Practice: A Review Article. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, **33**, 500–507.
- Jung, S.M., Lee, K., Lee, J.W., Namkoong, H., Kim, H.K., Kim, S., Na, H.R., Ha, S.-A., Kim, J.-R., Ko, J., & Kim, J.W. (2008) Both plasma retinol-binding protein and haptoglobin precursor allele 1 in CSF: candidate biomarkers for the progression of normal to mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*, **436**, 153–157.
- Kaminsky, Y.G., Marlatt, M.W., Smith, M.A., & Kosenko, E.A. (2010) Subcellular and metabolic examination of amyloid-beta peptides in Alzheimer disease pathogenesis: evidence for Abeta(25-35). *Exp. Neurol*, **221**, 26–37.
- Kapoor, A., Wang, B.-J., Hsu, W.-M., Chang, M.-Y., Liang, S.-M., & Liao, Y.-F. (2013) Retinoic acid-elicited RARα/RXRα signaling attenuates Aβ production by directly inhibiting γ-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. *ACS Chem Neurosci*, **4**, 1093–1100.
- Karran, E., Mercken, M., & de Strooper, B. (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 698–712.
- Kawahara, K., Suenobu, M., Ohtsuka, H., Kuniyasu, A., Sugimoto, Y., Nakagomi, M., Fukasawa, H., Shudo, K., & Nakayama, H. (2014) Cooperative therapeutic action of retinoic acid receptor and retinoid x receptor agonists in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*, **42**, 587–605.
- Kelly, M., Widjaja-Adhi, M.A.K., Palczewski, G., & Lintig, von, J. (2016) Transport of vitamin A across blood-tissue barriers is facilitated by STRA6. *FASEB J*, **30**, 2985–2995.
- Kempermann, G. (2015) Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **7**, a018929.
- Khalil, S., Bardawil, T., Stephan, C., Darwiche, N., Abbas, O., Kibbi, A.G., Nemer, G., & Kurban, M. (2017) Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *J Dermatolog Treat*, **28**, 684–696.
- Kitaoka, K., Shimizu, N., Ono, K., Chikahisa, S., Nakagomi, M., Shudo, K., Ishimura, K., Sei, H., & Yoshizaki, K. (2013) The retinoic acid receptor agonist Am80 increases hippocampal ADAM10 in aged SAMP8 mice. *Neuropharmacology*, **72**, 58–65.
- Knopman, D.S., Haeberlein, S.B., Carrillo, M.C., Hendrix, J.A., Kerchner, G., Margolin, R., Maruff, P., Miller, D.S., Tong, G., Tome, M.B., Murray, M.E., Nelson, P.T., Sano, M.,

- Mattsson, N., Sultzer, D.L., Montine, T.J., Jack, C.R., Kolb, H., Petersen, R.C., Vemuri, P., Canniere, M.Z., Schneider, J.A., Resnick, S.M., Romano, G., van Harten, A.C., Wolk, D.A., Bain, L.J., & Siemers, E. (2018) The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimers Dement*, **14**, 563–575.
- Koryakina, A., Aeberhard, J., Kiefer, S., Hamburger, M., & Kuenzi, P. (2009) Regulation of secretases by all-trans-retinoic acid. *FEBS J*, **276**, 2645–2655.
- Krezel, W., Ghyselink, N., Samad, T.A., Dupé, V., Kastner, P., Borrelli, E., & Chambon, P. (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science*, **279**, 863–867.
- Krezel, W., Kastner, P., & Chambon, P. (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience*, **89**, 1291–1300.
- Krezel, W., Rühl, R., & de Lera, A.R. (2019) Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol. Cell. Endocrinol*, **491**, 110436.
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagae, Y., & Kaneko, I. (2002) In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res*, **70**, 474–483.
- Kunzler, A., Kolling, E.A., da Silva, J.D., Gasparotto, J., de Bittencourt Pasquali, M.A., Moreira, J.C.F., & Gelain, D.P. (2017) Retinol (Vitamin A) Increases α -Synuclein, β -Amyloid Peptide, Tau Phosphorylation and RAGE Content in Human SH-SY5Y Neuronal Cell Line. *Neurochem. Res*, **42**, 2788–2797.
- Kwiatk-Majkusiak, J., Dickson, D.W., Tacik, P., Aoki, N., Tomasiuk, R., Kozirowski, D., & Friedman, A. (2015) Relationships between typical histopathological hallmarks and the ferritin in the hippocampus from patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **75**, 391–398.
- la Santé, de, O.M. (2016) Rapport mondial sur le vieillissement et la santé.
- Lahmy, V., Meunier, J., Malmström, S., Naert, G., Givalois, L., Kim, S.H., Villard, V., Vamvakides, A., & Maurice, T. (2013) Blockade of Tau hyperphosphorylation and $A\beta_{1-42}$ generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and σ_1 receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1706–1723.
- Lane, M.A. & Bailey, S.J. (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Prog. Neurobiol*, **75**, 275–293.
- Laursen, K.B., Kashyap, V., Scandura, J., & Gudas, L.J. (2015) An alternative retinoic acid-responsive Stra6 promoter regulated in response to retinol deficiency. *J. Biol. Chem*, **290**, 4356–4366.
- le Maire, A., Alvarez, S., Shankaranarayanan, P., Lera, A.R. de, Bourguet, W., & Gronemeyer, H. (2012) Retinoid receptors and therapeutic applications of RAR/RXR modulators. *Curr Top Med Chem*, **12**, 505–527.
- Lee, H.-P., Casadesus, G., Zhu, X., Lee, H.-G., Perry, G., Smith, M.A., Gustaw-Rothenberg, K., & Lerner, A. (2009) All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*, **9**, 1615–1621.
- Lee, J.-H. & Kim, K.-T. (2004) Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *J. Neurochem*, **91**, 634–647.
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013) Object recognition test in mice. *Nat Protoc*, **8**, 2531–2537.

- Leotsinidis, M., Alexopoulos, A., Schinas, V., Kardara, M., & Kondakis, X. (2000) Plasma retinol and tocopherol levels in greek elderly population from an urban and a rural area: associations with the dietary habits. *Eur. J. Epidemiol*, **16**, 1009–1016.
- Lerner, A.J., Gustaw-Rothenberg, K., Smyth, S., & Casadesus, G. (2012) Retinoids for treatment of Alzheimer's disease. *Biofactors*, **38**, 84–89.
- Lesne, S.E. (2014) Toxic oligomer species of amyloid- β in Alzheimer's disease, a timing issue. *Swiss Med Wkly*, **144**, w14021.
- Lester, A.W., Moffat, S.D., Wiener, J.M., Barnes, C.A., & Wolbers, T. (2017) The Aging Navigational System. *Neuron*, **95**, 1019–1035.
- Letondor, A., Buaud, B., Vaysse, C., Richard, E., Laye, S., Pallet, V., & Alfos, S. (2016) EPA/DHA and Vitamin A Supplementation Improves Spatial Memory and Alleviates the Age-related Decrease in Hippocampal RXR γ and Kinase Expression in Rats. *Front Aging Neurosci*, **8**, 103.
- Li, E. & Tso, P. (2003) Vitamin A uptake from foods. *Curr. Opin. Lipidol*, **14**, 241–247.
- Li, Y., Wongsiriroj, N., & Blaner, W.S. (2014) The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr*, **3**, 126–139.
- Lisman, J., Buzsáki, G., Eichenbaum, H., Nadel, L., Ranganath, C., & Redish, A.D. (2017) Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat. Neurosci*, **20**, 1434–1447.
- Lopes da Silva, S., Vellas, B., Elemans, S., Luchsinger, J., Kamphuis, P., Yaffe, K., Sijben, J., Groenendijk, M., & Stijnen, T. (2014) Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement*, **10**, 485–502.
- Lopez Sanchez, M.I.G., van Wijngaarden, P., & Trounce, I.A. (2019) Amyloid precursor protein-mediated mitochondrial regulation and Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol*, **176**, 3464–3474.
- Lopez-Teros, V., Chileshe, J., Idohou-Dossou, N., Fajarwati, T., Medoua Nama, G., Newton, S., Vinod Kumar, M., Wang, Z., Wasantwisut, E., & Hunt, J.R. (2014) International experiences in assessing vitamin A status and applying the vitamin A-labeled isotope dilution method. *Int J Vitam Nutr Res*, **84 Suppl 1**, 40–51.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 1194–1217.
- Lupo, G., Gaetani, S., Cacci, E., Biagioni, S., & Negri, R. (2019) Molecular Signatures of the Aging Brain: Finding the Links Between Genes and Phenotypes. *Neurotherapeutics*, **16**, 543–553.
- Maden, M. (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci*, **3**, 843–853.
- Mansbach, C.M. & Siddiqi, S.A. (2010) The biogenesis of chylomicrons. *Annu. Rev. Physiol*, **72**, 315–333.
- Marcotte, R., Lacelle, C., & Wang, E. (2004) Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech. Ageing Dev*, **125**, 777–783.
- Marissal-Arvy, N., Hamiani, R., Richard, E., Moisan, M.P., & Pallet, V. (2013) Vitamin A regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis status in LOU/C rats. *The Journal of endocrinology*, **219**, 21–27.
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011) Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int*, **58**, 458–471.
- Mather, K.A., Kwok, J.B., Armstrong, N., & Sachdev, P.S. (2014) The role of epigenetics in cognitive ageing. *Int J Geriatr Psychiatry*, **29**, 1162–1171.
- Maurice, T., Lockhart, B.P., & Privat, A. (1996) Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res*, **706**, 181–193.

- Maurice, T., Lockhart, B.P., Su, T.P., & Privat, A. (1996) Reversion of beta 25-35-amyloid peptide-induced amnesia by NMDA receptor-associated glycine site agonists. *Brain Res*, **731**, 249–253.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., & Bateman, R.J. (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, **330**, 1774.
- McCaffery, P., Zhang, J., & Crandall, J.E. (2006) Retinoic acid signaling and function in the adult hippocampus. *J. Neurobiol*, **66**, 780–791.
- McCaffery, P.J., Adams, J., Maden, M., & Rosa-Molinar, E. (2003) Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur. J. Neurosci*, **18**, 457–472.
- McHugh, D. & Gil, J. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol*, **217**, 65–77.
- McIlroy, G.D., Delibegovic, M., Owen, C., Stoney, P.N., Shearer, K.D., McCaffery, P.J., & Mody, N. (2013) Fenretinide treatment prevents diet-induced obesity in association with major alterations in retinoid homeostatic gene expression in adipose, liver, and hypothalamus. *Diabetes*, **62**, 825–836.
- McLean, A.J. & Le Couteur, D.G. (2004) Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev*, **56**, 163–184.
- Medina, M., Hernández, F., & Avila, J. (2016) New Features about Tau Function and Dysfunction. *Biomolecules*, **6**, 21.
- Melino, G., Draoui, M., Bernardini, S., Bellincampi, L., Reichert, U., & Cohen, P. (1996) Regulation by retinoic acid of insulin-degrading enzyme and of a related endoprotease in human neuroblastoma cell lines. *Cell Growth Differ*, **7**, 787–796.
- Meunier, J., Villard, V., Givalois, L., & Maurice, T. (2013) The γ -secretase inhibitor 2-[(1R)-1-[(4-chlorophenyl)sulfonyl](2,5-difluorophenyl) amino]ethyl-5-fluorobenzenebutanoic acid (BMS-299897) alleviates A β 1-42 seeding and short-term memory deficits in the A β 25-35 mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol*, **698**, 193–199.
- Mey, J. & McCaffery, P. (2004) Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist*, **10**, 409–421.
- Millucci, L., Ghezzi, L., Bernardini, G., & Santucci, A. (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr. Protein Pept. Sci*, **11**, 54–67.
- Milte, C.M. & McNaughton, S.A. (2016) Dietary patterns and successful ageing: a systematic review. *Eur J Nutr*, **55**, 423–450.
- Mingaud, F., Mormede, C., Etchamendy, N., Mons, N., Niedergang, B., Wietrzyk, M., Pallet, V., Jaffard, R., Krezel, W., Higuieret, P., & Marighetto, A. (2008) Retinoid hyposignaling contributes to aging-related decline in hippocampal function in short-term/working memory organization and long-term declarative memory encoding in mice. *J. Neurosci*, **28**, 279–291.
- Misner, D.L., Jacobs, S., Shimizu, Y., de Urquiza, A.M., Solomin, L., Perlmann, T., De Luca, L.M., Stevens, C.F., & Evans, R.M. (2001) Vitamin A deprivation results in reversible loss of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **98**, 11714–11719.
- Mody, N. (2017) Alterations in vitamin A/retinoic acid homeostasis in diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc*, **76**, 597–602.
- Montine, T.J., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Hyman, B.T., National Institute on Aging, Alzheimer's Association (2012) National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol*.

- Moodley, K., Minati, L., Contarino, V., Prioni, S., Wood, R., Cooper, R., D'Incerti, L., Tagliavini, F., & Chan, D. (2015) Diagnostic differentiation of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease using a hippocampus-dependent test of spatial memory. *Hippocampus*, **25**, 939–951.
- Morellini, F. (2013) Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell Tissue Res*, **354**, 273–286.
- Morris, M.C. (2016) Nutrition and risk of dementia: overview and methodological issues. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, **1367**, 31–37.
- Mosconi, L., Rahman, A., Diaz, I., Wu, X., Scheyer, O., Hristov, H.W., Vallabhajosula, S., Isaacson, R.S., de Leon, M.J., & Brinton, R.D. (2018) Increased Alzheimer's risk during the menopause transition: A 3-year longitudinal brain imaging study. *PLoS ONE*, **13**, e0207885.
- Moser, M.-B., Rowland, D.C., & Moser, E.I. (2015) Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **7**, a021808.
- Müller, U.C., Deller, T., & Korte, M. (2017) Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci*, **18**, 281–298.
- Naert, G., Ferré, V., Meunier, J., Keller, E., Malmström, S., Givalois, L., Carreaux, F., Bazureau, J.-P., & Maurice, T. (2015) Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric A β 25-35 peptide administration in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, **25**, 2170–2182.
- Nagele, E.P., Han, M., Acharya, N.K., DeMarshall, C., Kosciuk, M.C., & Nagele, R.G. (2013) Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS ONE*, **8**, e60726.
- Nalivaeva, N.N., Beckett, C., Belyaev, N.D., & Turner, A.J. (2012) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J. Neurochem*, **120 Suppl 1**, 167–185.
- Namitha, K.K. & Negi, P.S. (2010) Chemistry and biotechnology of carotenoids. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **50**, 728–760.
- Navigatore Fonzo, L.S., Golini, R.L., Ponce, I.T., Delgado, S.M., Plateo-Pignatari, M.G., Gimenez, M.S., & Anzulovich, A.C. (2013) Retinoic acid receptors move in time with the clock in the hippocampus. Effect of a vitamin-A-deficient diet. *J. Nutr. Biochem*, **24**, 859–867.
- Neves, G., Cooke, S.F., & Bliss, T.V.P. (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci*, **9**, 65–75.
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., Lindström, J., Mangialasche, F., Pajananen, T., Pajala, S., Peltonen, M., Rauramaa, R., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. (2015) A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*, **385**, 2255–2263.
- Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S., Mitsuda, K., Enomoto, H., Saito, K., Choi, T., Watabe, A.M., Kobayashi, S., Masushige, S., Manabe, T., & Kida, S. (2012) Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol Brain*, **5**, 8–15.
- O'Byrne, S.M. & Blamer, W.S. (2013) Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J. Lipid Res*, **54**, 1731–1743.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., & LaFerla, F.M. (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **24**, 1063–1070.

- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., & LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, **39**, 409–421.
- Oliveira, M.R. de (2015) The neurotoxic effects of vitamin A and retinoids. *An. Acad. Bras. Cienc*, **87**, 1361–1373.
- Olson, C.R. & Mello, C.V. (2010) Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning. *Mol Nutr Food Res*, **54**, 489–495.
- Ono, K. & Yamada, M. (2012) Vitamin A and Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*, **12**, 180–188.
- Ostan, R., Monti, D., Guerresi, P., Bussolotto, M., Franceschi, C., & Baggio, G. (2016) Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine. *Clin. Sci*, **130**, 1711–1725.
- Pannese, E. (2011) Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Struct Funct*, **216**, 85–89.
- Penniston, K.L. & Tanumihardjo, S.A. (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr*, **83**, 191–201.
- Peron, R., Vatanabe, I.P., Manzine, P.R., Camins, A., & Cominetti, M.R. (2018) Alpha-Secretase ADAM10 Regulation: Insights into Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals (Basel)*, **11**, 12.
- Petersen, R.C. (2016) Mild Cognitive Impairment. *Continuum (Minneap Minn)*, **22**, 404–418.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45–e45.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., & Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci*, **13**, 1676–1687.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., & Cotman, C.W. (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem*, **64**, 253–265.
- Pineau, F., Canet, G., Desrumaux, C., Hunt, H., Chevallier, N., Ollivier, M., Belanoff, J.K., & Givalois, L. (2016) New selective glucocorticoid receptor modulators reverse amyloid- β peptide-induced hippocampus toxicity. *Neurobiol. Aging*, **45**, 109–122.
- Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., & Pearson, H.A. (2003) The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci*, **23**, 5531–5535.
- Plant, L.D., Webster, N.J., Boyle, J.P., Ramsden, M., Freir, D.B., Peers, C., & Pearson, H.A. (2006) Amyloid beta peptide as a physiological modulator of neuronal "A"-type K⁺ current. *Neurobiol. Aging*, **27**, 1673–1683.
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008) Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci*, **28**, 14537–14545.
- Quadro, L., Blaner, W.S., Salchow, D.J., Vogel, S., Piantadosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M.P., Colantuoni, V., & Gottesman, M.E. (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J*, **18**, 4633–4644.
- Querfurth, H.W. & LaFerla, F.M. (2010) Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*, **362**, 329–344.
- Ransom, J., Morgan, P.J., McCaffery, P.J., & Stoney, P.N. (2014) The rhythm of retinoids in the brain. *J. Neurochem*, **129**, 366–376.

- Regan, P., Whitcomb, D.J., & Cho, K. (2017) Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *Neuroscientist*, **23**, 137–151.
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011) Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, **7**, 137–152.
- Richard, E.M., Helbling, J.-C., Tridon, C., Desmedt, A., Minni, A.M., Cador, M., Pourtau, L., Konsman, J.-P., Mormède, P., & Moisan, M.-P. (2010) Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology*, **151**, 649–659.
- Rinaldi, P., Polidori, M.C., Metastasio, A., Mariani, E., Mattioli, P., Cherubini, A., Catani, M., Cecchetti, R., Senin, U., & Mecocci, P. (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **24**, 915–919.
- Ross, A.C. & Zolfaghari, R. (2011) Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr*, **31**, 65–87.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., & De Luca, L.M. (2000) Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev*, **80**, 1021–1054.
- Rowe, J.W. & Kahn, R.L. (1987) Human aging: usual and successful. *Science*, **237**, 143–149.
- Rönnlund, M., Nyberg, L., Bäckman, L., & Nilsson, L.-G. (2005) Stability, growth, and decline in adult life span development of declarative memory: cross-sectional and longitudinal data from a population-based study. *Psychol Aging*, **20**, 3–18.
- Sadigh-Eteghad, S., Sabermarouf, B., Majdi, A., Talebi, M., Farhoudi, M., & Mahmoudi, J. (2015) Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease. *Med Princ Pract*, **24**, 1–10.
- Saeed, A., Hoekstra, M., Hoeke, M.O., Heegsma, J., & Faber, K.N. (2017) The interrelationship between bile acid and vitamin A homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, **1862**, 496–512.
- Saido, T. & Leissring, M.A. (2012) Proteolytic degradation of amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, a006379–a006379.
- Salthouse, T.A. (2009) When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiol. Aging*, **30**, 507–514.
- Sarti, F., Zhang, Z., Schroeder, J., & Chen, L. (2013) Rapid suppression of inhibitory synaptic transmission by retinoic acid. *J. Neurosci*, **33**, 11440–11450.
- Saura-Calixto, F. & Pérez-Jiménez, J. (2018) *Non-Extractable Polyphenols and Carotenoids*. Royal Society of Chemistry.
- Sauvant, P., Cansell, M., & Atgié, C. (2011) Vitamin A and lipid metabolism: relationship between hepatic stellate cells (HSCs) and adipocytes. *J. Physiol. Biochem*, **67**, 487–496.
- Sárvári, M., Kalló, I., Hrabovszky, E., Solymosi, N., Rodolosse, A., Vastagh, C., Auer, H., & Liposits, Z. (2015) Hippocampal Gene Expression Is Highly Responsive to Estradiol Replacement in Middle-Aged Female Rats. *Endocrinology*, **156**, 2632–2645.
- Scarmeas, N., Anastasiou, C.A., & Yannakoulia, M. (2018) Nutrition and prevention of cognitive impairment. *Lancet Neurol*, **17**, 1006–1015.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., de Strooper, B., Frisoni, G.B., Salloway, S., & Van der Flier, W.M. (2016) Alzheimer's disease. *Lancet*, **388**, 505–517.
- Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R.S., Diaz Brinton, R., & Mosconi, L. (2018) Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection. *J Prev Alzheimers Dis*, **5**, 225–230.
- Schindler, S.E., Bollinger, J.G., Ovod, V., Mawuenyega, K.G., Li, Y., Gordon, B.A., Holtzman, D.M., Morris, J.C., Benzinger, T.L.S., Xiong, C., Fagan, A.M., & Bateman, R.J. (2019) High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*, **93**, e1647–e1659.

- Semba, R.D. (2012) On the “discovery” of vitamin A. *Ann. Nutr. Metab*, **61**, 192–198.
- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Morgan, P.J., & McCaffery, P.J. (2012) A vitamin for the brain. *Trends Neurosci*, **35**, 733–741.
- Silva, M.V.F., Loures, C. de M.G., Alves, L.C.V., de Souza, L.C., Borges, K.B.G., & Carvalho, M.D.G. (2019) Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci*, **26**, 33–11.
- Skaper, S.D. (2012) Alzheimer's disease and amyloid: culprit or coincidence? *Int Rev Neurobiol*, **102**, 277–316.
- Sodhi, R.K. & Singh, N. (2014) Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease. *Pharmacol Biochem Behav*, **120**, 117–123.
- Sommer, A., Davidson, F.R., Anney Accords (2002) Assessment and control of vitamin A deficiency: the Anney Accords. *J. Nutr*, **132**, 2845S–2850S.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., & Frisén, J. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, **153**, 1219–1227.
- St-Amour, I., Cicchetti, F., & Calon, F. (2016) Immunotherapies in Alzheimer's disease: Too much, too little, too late or off-target? *Acta Neuropathol*, **131**, 481–504.
- St-Amour, I., Pare, I., Tremblay, C., Coulombe, K., Bazin, R., & Calon, F. (2014) IVIg protects the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease from memory deficit and Aβ pathology. *J Neuroinflammation*, **11**, 54.
- Stevens, G.A., Bennett, J.E., Hennocq, Q., Lu, Y., De-Regil, L.M., Rogers, L., Danaei, G., Li, G., White, R.A., Flaxman, S.R., Oehrle, S.-P., Finucane, M.M., Guerrero, R., Bhutta, Z.A., Then-Paulino, A., Fawzi, W., Black, R.E., & Ezzati, M. (2015) Trends and mortality effects of vitamin A deficiency in children in 138 low-income and middle-income countries between 1991 and 2013: a pooled analysis of population-based surveys. *Lancet Glob Health*, **3**, e528–e536.
- Stoney, P.N. & McCaffery, P. (2016) A Vitamin on the Mind: New Discoveries on Control of the Brain by Vitamin A. *World Rev Nutr Diet*, **115**, 98–108.
- Stoney, P.N., Fragoso, Y.D., Saeed, R.B., Ashton, A., Goodman, T., Simons, C., Gomaa, M.S., Sementilli, A., Sementilli, L., Ross, A.W., Morgan, P.J., & McCaffery, P.J. (2016) Expression of the retinoic acid catabolic enzyme CYP26B1 in the human brain to maintain signaling homeostasis. *Brain Struct Funct*, **221**, 3315–3326.
- Succari, M., Garric, B., Ponteziere, C., Miocque, M., & Cals, M.J. (1991a) Influence of sex and age on vitamin A and E status. *Age Ageing*, **20**, 413–416.
- Succari, M., Garric, B., Ponteziere, C., Miocque, M., & Cals, M.J. (1991b) Influence of sex and age on vitamin A and E status. *Age Ageing*, **20**, 413–416.
- Sun, M.-K. & Alkon, D.L. (2002) Impairment of hippocampal CA1 heterosynaptic transformation and spatial memory by beta-amyloid(25-35). *J. Neurophysiol*, **87**, 2441–2449.
- Sura, L., Madhavan, A., Carnaby, G., & Crary, M.A. (2012) Dysphagia in the elderly: management and nutritional considerations. *Clin Interv Aging*, **7**, 287–298.
- Swanwick, G.R., Kirby, M., Bruce, I., Buggy, F., Coen, R.F., Coakley, D., & Lawlor, B.A. (1998) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in Alzheimer's disease: lack of association between longitudinal and cross-sectional findings. *Am J Psychiatry*, **155**, 286–289.
- Tachibana, M., Shinohara, M., Yamazaki, Y., Liu, C.-C., Rogers, J., Bu, G., & Kanekiyo, T. (2016) Rescuing effects of RXR agonist bexarotene on aging-related synapse loss depend on neuronal LRP1. *Exp. Neurol*, **277**, 1–9.
- Takamura, R., Watamura, N., Nikkuni, M., & Ohshima, T. (2017) All-trans retinoic acid improved impaired proliferation of neural stem cells and suppressed microglial

- activation in the hippocampus in an Alzheimer's mouse model. *J. Neurosci. Res*, **95**, 897–906.
- Tanoury, Al, Z., Piskunov, A., & Rochette-Egly, C. (2013) Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J. Lipid Res*, **54**, 1761–1775.
- Tanumihardjo, S.A. (2011) Vitamin A: biomarkers of nutrition for development. In 6 edn. Presented at the The American journal of clinical nutrition, pp. 658S–65S.
- Tanumihardjo, S.A. (2014) Usefulness of vitamin A isotope methods for status assessment: from deficiency through excess. *Int J Vitam Nutr Res*, **84 Suppl 1**, 16–24.
- Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M.J. (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, **11**, 457–470.
- Tariot, P.N. & Federoff, H.J. (2003) Current treatment for Alzheimer disease and future prospects. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **17 Suppl 4**, S105–S113.
- Tayeb, H.O., Yang, H.D., Price, B.H., & Tarazi, F.I. (2012) Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther*, **134**, 8–25.
- Teletin, M., Vernet, N., Ghyselinck, N.B., & Mark, M. (2017) Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol*, **125**, 191–225.
- Thacher, S.M., Vasudevan, J., & Chandraratna, R.A. (2000) Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Curr Pharm Des*, **6**, 25–58.
- Thompson Haskell, G., Maynard, T.M., Shatzmiller, R.A., & Lamantia, A.-S. (2002) Retinoic acid signaling at sites of plasticity in the mature central nervous system. *J. Comp. Neurol*, **452**, 228–241.
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., & Fahrenholz, F. (2009) Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J*, **23**, 1643–1654.
- Tournissac, M., Bourassa, P., Martinez-Cano, R.D., Vu, T.-M., Hébert, S.S., Planel, E., & Calon, F. (2019) Repeated cold exposures protect a mouse model of Alzheimer's disease against cold-induced tau phosphorylation. *Mol Metab*, **22**, 110–120.
- Touyarot, K., Bonhomme, D., Roux, P., Alfos, S., Lafenêtre, P., Richard, E., Higuere, P., & Pallet, V. (2013) A mid-life vitamin A supplementation prevents age-related spatial memory deficits and hippocampal neurogenesis alterations through CRABP-I. *PLoS ONE*, **8**, e72101.
- Tremblay, C., François, A., Delay, C., Freland, L., Vandal, M., Bennett, D.A., & Calon, F. (2017) Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, **275**, 204.
- Tremblay, C., Pilote, M., Phivilay, A., Emond, V., Bennett, D.A., & Calon, F. (2007) Biochemical characterization of Abeta and tau pathologies in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **12**, 377–390.
- Tromp, D., Dufour, A., Lithfous, S., Pebayle, T., & Després, O. (2015) Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res. Rev*, **24**, 232–262.
- Trubetskaya, V.V., Stepanichev, M.Y., Onufriev, M.V., Lazareva, N.A., Markevich, V.A., & Gulyaeva, N.V. (2003) Administration of aggregated beta-amyloid peptide (25-35) induces changes in long-term potentiation in the hippocampus in vivo. *Neurosci. Behav. Physiol*, **33**, 95–98.
- Tso, P. & Balint, J.A. (1986) Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am. J. Physiol*, **250**, G715–G726.

- Vandal, M., White, P.J., Chevrier, G., Tremblay, C., St-Amour, I., Planel, E., Marette, A., & Calon, F. (2015) Age-dependent impairment of glucose tolerance in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, **29**, 4273–4284.
- Vandal, M., White, P.J., Tremblay, C., St-Amour, I., Chevrier, G., Emond, V., Lefrancois, D., Virgili, J., Planel, E., Giguere, Y., Marette, A., & Calon, F. (2014) Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain Abeta and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes*, **63**, 4291–4301.
- Vega, J.N. & Newhouse, P.A. (2014) Mild cognitive impairment: diagnosis, longitudinal course, and emerging treatments. *Curr Psychiatry Rep*, **16**, 490.
- Vieira, M. & Saraiva, M.J. (2014) Transthyretin: a multifaceted protein. *Biomol Concepts*, **5**, 45–54.
- Viña, J. & Sanz-Ros, J. (2018) Alzheimer's disease: Only prevention makes sense. *Eur. J. Clin. Invest*, **48**, e13005.
- Visvanathan, R. & Chapman, I.M. (2009) Undernutrition and anorexia in the older person. *Gastroenterol Clin North Am*, **38**, 393–409.
- Vogel, S., Piantedosi, R., O'Byrne, S.M., Kako, Y., Quadro, L., Gottesman, M.E., Goldberg, I.J., & Blamer, W.S. (2002) Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry*, **41**, 15360–15368.
- Voss, J.L., Bridge, D.J., Cohen, N.J., & Walker, J.A. (2017) A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)*, **21**, 577–588.
- Vyas, S. & Maatouk, L. (2013) Contribution of glucocorticoids and glucocorticoid receptors to the regulation of neurodegenerative processes. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **12**, 1175–1193.
- Wahl, D., Coogan, S.C., Solon-Biet, S.M., de Cabo, R., Haran, J.B., Raubenheimer, D., Cogger, V.C., Mattson, M.P., Simpson, S.J., & Le Couteur, D.G. (2017) Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin Interv Aging*, **12**, 1419–1428.
- Wang, C., Chen, T., Li, G., Zhou, L., Sha, S., & Chen, L. (2015) Simvastatin prevents β -amyloid(25-35)-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through α 7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology*, **97**, 122–132.
- Wang, R., Chen, S., Liu, Y., Diao, S., Xue, Y., You, X., Park, E.A., & Liao, F.-F. (2015) All-trans-retinoic acid reduces BACE1 expression under inflammatory conditions via modulation of nuclear factor κ B (NF κ B) signaling. *J. Biol. Chem*, **290**, 22532–22542.
- Wang, Y., Shen, J., Yang, X., Jin, Y., Yang, Z., Wang, R., Zhang, F., & Linhardt, R.J. (2018) Akebia saponin D reverses corticosterone hypersecretion in an Alzheimer's disease rat model. *Biomed. Pharmacother*, **107**, 219–225.
- Watamura, N., Toba, J., Yoshii, A., Nikkuni, M., & Ohshima, T. (2016) Colocalization of phosphorylated forms of WAVE1, CRMP2, and tau in Alzheimer's disease model mice: Involvement of Cdk5 phosphorylation and the effect of ATRA treatment. *J. Neurosci. Res*, **94**, 15–26.
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., & Van Eldik, L.J. (2014) Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*, **5**, 88.
- Weikum, E.R., Liu, X., & Ortlund, E.A. (2018) The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*, **27**, 1876–1892.
- Werner, E.A. & Deluca, H.F. (2002) Retinoic acid is detected at relatively high levels in the CNS of adult rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*, **282**, E672–E678.
- West, K.P. (2003) Vitamin A deficiency disorders in children and women. *Food Nutr Bull*, **24**, S78–S90.

- Wheelan, N., Kenyon, C.J., Harris, A.P., Cairns, C., Dujaili, Al, E., Seckl, J.R., & Yau, J.L.W. (2018) Midlife stress alters memory and mood-related behaviors in old age: Role of locally activated glucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology*, **89**, 13–22.
- Wietrzych, M., Meziane, H., Sutter, A., Ghyselinck, N., Chapman, P.F., Chambon, P., & Krezel, W. (2005) Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn. Mem*, **12**, 318–326.
- Willis, H. (2017) Causes, assessment and treatment of malnutrition in older people. *Nurs Older People*, **29**, 20–25.
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M.O., Qiu, C., Sakmar, T.P., Scheltens, P., Schneider, L.S., Sperling, R., Tjernberg, L.O., Waldemar, G., Wimo, A., & Zetterberg, H. (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol*, **15**, 455–532.
- World Health Organization (2009) Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995-2005: WHO global database on vitamin A deficiency.
- Yamagata, Y., Takaki, E., Shinagawa, M., Okada, M., Jozaki, K., Lee, L., Sato, S., Maekawa, R., Taketani, T., Asada, H., Tamura, H., Nakai, A., & Sugino, N. (2015) Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. *J Ovarian Res*, **8**, 49–7.
- Yan, Y., Dominguez, S., Fisher, D.W., & Dong, H. (2018) Sex differences in chronic stress responses and Alzheimer's disease. *Neurobiol Stress*, **8**, 120–126.
- Yang, J.-T., Wang, Z.-J., Cai, H.-Y., Yuan, L., Hu, M.-M., Wu, M.-N., & Qi, J.-S. (2018) Sex Differences in Neuropathology and Cognitive Behavior in APP/PS1/tau Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurosci Bull*, **34**, 736–746.
- Yilmaz, B.D. & Bulun, S.E. (2019) Endometriosis and nuclear receptors. *Hum. Reprod. Update*, **25**, 473–485.
- You, X., Zhang, Y.-W., Chen, Y., Huang, X., Xu, R., Cao, X., Chen, J., Liu, Y., Zhang, X., & Xu, H. (2009) Retinoid X receptor-alpha mediates (R)-flurbiprofen's effect on the levels of Alzheimer's beta-amyloid. *J. Neurochem*, **111**, 142–149.
- Young, M.L. & Franklin, J.L. (2019) The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ inhibits memory loss, neuropathology, and extends lifespan in aged 3xTg-AD mice. *Mol. Cell. Neurosci*, **101**, 103409.
- Zanco, M., Plácido, J., Marinho, V., Ferreira, J.V., de Oliveira, F., Monteiro-Junior, R., Barca, M., Engedal, K., Laks, J., & Deslandes, A. (2018) Spatial Navigation in the Elderly with Alzheimer's Disease: A Cross-Sectional Study. *J. Alzheimers Dis*, **66**, 1683–1694.
- Zeng, J., Chen, L., Wang, Z., Chen, Q., Fan, Z., Jiang, H., Wu, Y., Ren, L., Chen, J., Li, T., & Song, W. (2017) Marginal vitamin A deficiency facilitates Alzheimer's pathogenesis. *Acta Neuropathol*, **133**, 967–982.
- Zeng, J., Li, T., Gong, M., Jiang, W., Yang, T., Chen, J., Liu, Y., & Chen, L. (2017) Marginal Vitamin A Deficiency Exacerbates Memory Deficits Following Aβ1-42 Injection in Rats. *Curr Alzheimer Res*, **14**, 562–570.
- Zetterberg, H. & Schott, J.M. (2019) Biomarkers for Alzheimer's disease beyond amyloid and tau. *Nat. Med*, **25**, 201–203.
- Zhao, J., Fu, Y., Liu, C.-C., Shinohara, M., Nielsen, H.M., Dong, Q., Kanekiyo, T., & Bu, G. (2014) Retinoic acid isomers facilitate apolipoprotein E production and lipidation in astrocytes through the retinoid X receptor/retinoic acid receptor pathway. *J. Biol. Chem*, **289**, 11282–11292.

- Zhao, L., Mao, Z., Chen, S., Schneider, L.S., & Brinton, R.D. (2013) Early intervention with an estrogen receptor β -selective phytoestrogenic formulation prolongs survival, improves spatial recognition memory, and slows progression of amyloid pathology in a female mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*, **37**, 403–419.
- Zou, K., Gong, J.S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2002) A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. Neurosci*, **22**, 4833–4841.
- Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G., Naert, G., Meunier, J., Chevallier, N., Maurice, T., & Givalois, L. (2011) Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *Am. J. Pathol*, **179**, 315–334.
- Zussy, C., Brureau, A., Keller, E., Marchal, S., Blayo, C., Delair, B., Ixart, G., Maurice, T., & Givalois, L. (2013) Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid-beta peptide injection in rats. *PLoS ONE*, **8**, e53117.